

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'**Université de Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale **GAIA**
Et de l'unité de recherche **UMR MARBEC**

Spécialité: **Sciences de la Mer**

Présentée par **Fany Sardenne**

**Des relations trophiques à l'état de
santé : allocation d'énergie chez les
thons tropicaux
Cas de l'Ouest de l'océan Indien**

Soutenue le lundi 2 mai 2016 devant le jury composé de

Dr Chantal CAHU	DR	Ifremer, Brest	Rapporteur
Dr Jean-Marc ROUSSEL	DR	INRA, Rennes	Rapporteur
Dr David MCKENZIE	DR	CNRS, Montpellier	Examineur
Dr Sébastien JAQUEMET	MCF	Univ. La Réunion	Examineur
Dr Nathalie BODIN	CR	IRD, Seychelles	Encadrant
Dr Frédéric MENARD	DR	IRD, Marseille	Encadrant



Des relations trophiques à l'état de santé : allocation d'énergie
chez les thons tropicaux

Cas de l'ouest de l'océan Indien

Remerciements

Voilà trois années riches et intenses qui se terminent, entre les Seychelles, Sète, Toulouse, Brest et ponctuellement Marseille, et durant lesquelles beaucoup de personnes m'ont entourées et ont contribué à ce travail.

Tout d'abord, un immense merci à Nathalie Bodin pour m'avoir fait confiance tout au long de cette thèse et pour s'être investie dans ce projet avec une énergie incroyable qui n'a eu d'égal que sa détermination. Un grand merci aussi à Frédéric Ménard qui a accepté de co-encadrer cette thèse et s'y est largement investi malgré de nombreuses obligations. Merci aussi à Laurent Dagorn qui a accepté d'être le directeur administratif de cette thèse. Et un grand merci à Emmanuel Chassot, qui m'a ouvert une porte sur le monde de la recherche et qui s'est activement investi dans ce travail.

Je tiens à remercier tous les membres du jury d'avoir accepté de corriger et juger ce travail, et également Audrey Darnaude, Yves Cherel et Thierry Bouvier pour avoir accepté de participer à mes comités de thèse et m'avoir fait de judicieux conseils et remarques.

Par ordre d'apparition, un grand merci à l'équipage du Belouve de m'avoir accueillie à bord pendant plus de cinq semaines et expliqué les rudiments de la pêche au thon. Un grand merci également à tous les membres de la SFA pour leur aide précieuse et leur bonne humeur communicative lors des échantillonnages et dissections, et sans qui rien n'aurait pu se faire. Merci également au personnel de la conserverie IOT qui nous a facilité la tâche lors des échantillonnages.

Pour m'avoir formée à la préparation des échantillons pour l'analyse des isotopes stables, merci à François Le Loc'h et à Jean-Baptiste Tissot. Merci aussi à Luisa Metral et Tom Berteaux pour m'avoir facilité le travail dans les laboratoires MARBEC à Sète, et un grand merci à Maxime Degroote mais aussi à Adeline Anglés et Luz Nava-Anda pour avoir préparé un grand nombre d'échantillons lors de leurs stages. Merci aussi aux secrétaires de MARBEC qui m'ont toujours facilité la tâche entre les commandes, les missions et l'administratif. Je remercie aussi le LIENSs d'avoir analysé en isotopie tous nos échantillons, et notamment Gaël Guillou pour sa réactivité lors de *rush*.

Un grand merci à Hervé Guillou et Laurent Debrauwer de m'avoir laissé l'accès aux laboratoires TOXALIM à Toulouse pendant plusieurs mois, et un immense merci à tous les techniciens, ingénieurs et doctorantes qui m'ont formée et éclairée de leurs expertises pendant ces longs mois. Je tiens à remercier particulièrement Aurélien Amiel et Edwin Fouché, les spécialistes en préparation d'acides gras, sans qui je serais encore à la paillassse et dont la contribution à ce travail est considérable.

Je remercie aussi le LEMAR de m'avoir accueillie à Brest pendant les derniers mois de thèse et merci aux copains qui s'y trouvent pour leur soutien, conseils et relecture. Merci à Fabienne Le Grand pour m'avoir initiée aux joies de l'HPTLC, ainsi qu'à Gauthier Schaal et Edouard Kraffe pour leurs avis et conseils sur les acides gras.

Un énorme merci à tous les copains Brestois mais aussi aux Sétois qui ont toujours été là, et sans qui la thèse, les soirées et les week-ends seraient bien tristes. J'épargnerai la liste des noms au lecteur, mais j'espère que tous les concernés sauront s'y retrouver !

Je remercie aussi très fort ma famille et en particulier mes parents pour leur soutien tout au long de mes années d'étude, mais aussi et surtout pour tout le reste, qui nécessiterait bien plus que des remerciements. Enfin, des remerciements sont superflus mais toute ma reconnaissance va à Pierre-Yves, qui embellit mon quotidien.

Résumé : Les thons tropicaux (thon jaune, thon obèse et bonite à ventre rayé) sont des espèces largement exploitées dont un quart des prises mondiales provient de l’océan Indien. Capturés en bancs mixtes à la senne, ces prédateurs de haut niveau trophique présentent une physiologie particulière (e.g. thermorégulation partielle, nage obligatoire) mais différents traits de vie (e.g. taille maximale, stratégie de reproduction). L’objectif est ici de contribuer à une meilleure compréhension de l’allocation d’énergie chez ces espèces. Pour cela un échantillonnage mensuel a été mis en place en 2013 aux Seychelles, de manière à collecter des thons sur une large gamme de taille et de conditions environnementales. Un premier travail méthodologique nous a conduit à étudier l’effet de la teneur en lipides sur les valeurs isotopiques, et nous avons montré que l’utilisation d’équation de correction du taux de lipides lors des analyses isotopiques nécessite un ajustement spécifique. Au travers de traceurs écologiques (isotopes stables du carbone et de l’azote et acides gras), une comparaison trophique des trois espèces a montré qu’elles n’exploitent pas exactement les mêmes ressources énergétiques, notamment grâce à un changement alimentaire au cours de l’ontogénie. Ce changement se traduit par l’assimilation de proies plus riches en acides gras mono-insaturés pour les individus supérieurs à 100 cm FL. L’étude des contenus en lipides et protéines de quatre tissus aux fonctions physiologiques différentes (muscles blanc et rouge, foie et gonades) a montré que ces espèces font peu de réserves énergétiques et uniquement dans le foie et le muscle rouge. Les mâles consacrent également moins d’énergie que les femelles à la synthèse de cellules germinales. D’autre part, seul l’indice gonado-somatique permet de rendre compte de variations énergétiques, les autres indices testés (facteur de condition de Le Cren, indice hépato-somatique et circonférence) sont de mauvais proxies du contenu énergétique des tissus. Enfin, l’étude des acides gras membranaires indique une incorporation particulière du 20:4 ω 6 et du 22:6 ω 3, dont le niveau varie avec l’ontogénie et selon les tissus. Une grande variabilité intra-spécifique est cependant observée et suggère une certaine plasticité physiologique chez ces espèces.

Mots clés : condition, isotopes stables, acides gras neutres et polaires, composition proximale, ontogénie.

Abstract: Tropical tunas (yellowfin, bigeye and skipjack tuna) are exploited worldwide with a quarter of the catches coming from Indian Ocean. Caught by purse seine in mixed schools, these top predators displayed a specific physiology (e.g. partial endothermy, ram-ventilators) but various life history traits (e.g. maximal size, reproduction batches). The objective of this work is to contribute to a better understanding of energy allocation in these species. For this purpose, a monthly sampling was carry out throughout 2013 in Seychelles, to collect tunas on a large range size and environmental conditions. In a first methodological step, we studied the lipids influence on isotopic values in tropical tunas and showed that using mathematical correction of lipids content requires a specific adjustment. Then, using ecological tracers (stable isotope of carbon and nitrogen and fatty acids), a trophic comparison of the three species showed that they do not exploited exactly the same energetic resources, especially due to an ontogenic diet shift. This shift was illustrated by an increasing assimilation of mono-unsaturated fatty acids over 100 cm FL. Study of lipid and protein content in four tissues presenting different physiological function (white and red muscles, liver, gonads) showed these species make little energetic reserves, only in liver and red muscle. In addition, males invest less energy for germinal cells production than females. Furthermore, only the gonado-somatic index brought information concerning energetic variations, the others tested indices (Le Cren condition factor, hepato-somatic index, girth) were bad proxies of energetic content in tissues. Finally, study of membrane fatty acids indicates a specific incorporation of 20:4 ω 6 and 22:6 ω 3 that varies with ontogeny. A great intra-specific variability was also observed and could suggest a specific physiological plasticity in these species.

Key words: condition, stable isotopes, neutral and polar fatty acids, proximate composition, ontogeny.

Principales abréviations

FR	EN	Définitions
AG	FA	Acide gras / Fatty acid
AGMI	MUFA	Acide gras mono-insaturé / Mono-unsaturated fatty acid
AGPI	PUFA	Acide gras poly-insaturé / Poly-unsaturated fatty acid
AGS	SFA	Acide gras saturé / Saturated fatty acid
–	AIM	Autumn Inter-Monsoon
ARA	ARA	Acide arachidonique / Arachidonic acid (20:4 ω 6)
BET	BET	Thon obèse / Bigeye tuna (<i>Thunnus obesus</i>)
CTOI	IOTC	Commission des thons de l’océan Indien / Indian ocean tuna commission
DHA	DHA	Acide docosahexaénoïque / Docosahexaenoic acid (22:6 ω 3)
DCP	FAD	Dispositif de concentration de poisson / Fish aggregating device
–	EFA	Essential fatty acid
EPA	EPA	Acide eicosapentaénoïque / Eicosapentaenoic acid (20:5 ω 3)
GSI	GSI	Indice gonado-somatique / Gonado-somatic index
HSI	HSI	Indice hépato-somatique / Hepato-somatic index
IS	SI	Isotope stable / Stable isotope
LN	NL	Lipide neutre / Neutral lipid
LP	PL	Lipide polaire / Polar lipid
MOZ	MOZ	Canal du Mozambique / Mozambique channel
–	NEM	North-Eastern Monsoon
SKJ	SKJ	Bonite à ventre rayé / Skipjack tuna (<i>Katsuwonus pelamis</i>)
–	SIM	Spring Inter-Monsoon
–	SWM	South Western Monsoon
TAG	TAG	Triglycéride / Triacylglycerol
ST	ST	Stérol / Sterol
WCIO	WCIO	Océan Indien ouest et central / Western-central Indian Ocean
YFT	YFT	Thon jaune / Yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>)

Table des matières

Résumé / Abstract	4
Principales abréviations	6
Contexte général	19
I Contexte bibliographique	21
1 Les thons tropicaux de l’océan Indien	23
1.1 L’Ouest de l’océan Indien et la pêche thonière	23
1.1.1 Spécificités environnementales	23
1.1.2 Pêche thonière à la senne	24
1.2 Biologie et écologie des thons tropicaux	26
1.2.1 Phylogénie et particularités physiologiques	26
1.2.2 Distribution verticale	28
1.2.3 Différentes histoires de vie	28
1.2.4 Écologie trophique	30
2 État de santé et allocation d’énergie chez les poissons	33
2.1 Définitions et considérations générales	33
2.1.1 La condition comme état de santé des poissons	33
2.1.2 Allocation ou redistribution de l’énergie assimilée	34
Objectifs de la thèse	41
II Une approche multi-tissus et multi-traceurs: présentation des outils et de leurs méthodes d’analyses	43
3 Une approche multi-tissus et multi-traceurs	45
3.1 Tissus représentant des grandes fonctions biologiques	45
3.2 Traceurs énergétiques et trophiques	46
3.2.1 Composition proximale et classes de lipides	46
3.2.2 Les acides gras (AG)	47
3.2.3 Les isotopes stables du carbone et de l’azote	50

4	Échantillonnage et protocoles d'analyse des tissus	55
4.1	Sélection des thons, mesures morphométriques et prélèvement des tissus	55
4.2	Protocoles d'analyse des tissus	57
4.2.1	Extraction et analyses des classes de lipides et acides gras sur tissu frais	58
4.2.2	Dosage des protéines	61
4.2.3	Isotopes stables du carbone et de l'azote	62
III	Résultats	65
5	Méthodes de normalisation des lipides pour l'analyse isotopique des tissus de thon	67
5.1	Abstract	69
5.2	Introduction	70
5.3	Material and method	71
5.3.1	Fish and tissue collection	71
5.3.2	Carbon and nitrogen stable isotope analysis	73
5.3.3	Lipid class and protein analyses	74
5.3.4	Statistical analyses and models	74
5.4	Results	75
5.4.1	Bulk tissue characteristics	75
5.4.2	Influence of lipid extraction on tissue isotopic composition	77
5.4.3	Lipid correction models for $\delta^{13}\text{C}$ values	78
5.5	Discussion	80
5.5.1	Lipid correction models	81
5.5.2	Tissue metabolism and isotopic composition	83
6	Compétition trophique et changements alimentaires ontogéniques chez les thons tropicaux	87
6.1	Abstract	89
6.2	Introduction	90
6.3	Material and method	91
6.3.1	Tuna and tissue collection	91
6.3.2	Trophic tracer analyses	91
6.3.3	Data analyses	92
6.4	Results	94
6.4.1	Inter-specific differences	94
6.4.2	Intra-specific variability focusing on ontogenetic shifts	99
6.5	Discussion	104
6.5.1	FA and SI compositions of tuna preys	104
6.5.2	Trophic partitioning in tuna aggregations	105
6.5.3	Diet changes during tuna ontogeny	106
6.5.4	Conclusion	108
6.6	Supplementary Material	108

7	Composition proximale des tissus et condition des individus	115
7.1	Abstract	117
7.2	Introduction	117
7.3	Material and methods	119
7.3.1	Data collection	119
7.3.2	Biochemical analyses	119
7.3.3	Biometric and biochemical indicators	120
7.3.4	Statistical analyses	122
7.4	Results	122
7.4.1	Changes in proximate composition	122
7.4.2	Correlation between biochemical and biometric indices	123
7.4.3	Empirical models for prediction of biochemical contents	125
7.5	Discussion	125
7.5.1	Variability in biochemical composition of tuna tissues	127
7.5.2	Weakness of biometric indices	129
8	Influence des facteurs biologiques et environnementaux sur la composition en acide gras	131
8.1	Abstract	133
8.2	Introduction	134
8.3	Material and methods	135
8.3.1	Tuna and tissue collection	135
8.3.2	Lipid extraction	135
8.3.3	Neutral and polar lipids quantification	135
8.3.4	Fatty acids analyses	136
8.3.5	Data analyses	136
8.4	Results	137
8.4.1	Species and tissue-specific distribution of NL and PL in tropical tunas	137
8.4.2	Fatty acids of NL and PL	138
8.4.3	Sources of variation of fatty acids of PL	140
8.4.4	Sources of variation of fatty acids in NL	143
8.5	Discussion	144
8.5.1	Structural and storage lipids in tropical tunas	144
8.5.2	Fatty acid distribution in structural and storage lipids	146
8.5.3	Inter-individual variability and ecophysiological implication	147
8.5.4	Conclusion	148
IV	Discussion générale et perspectives	149
	Annexe A : Stades de maturité chez les thons tropicaux	192
	Annexe B : Compositions isotopiques et lipidiques de proies des thons tropicaux	193

Liste des figures

1.1	Direction des vents (en vert) et courants (chaud en rouge et froid en bleu) dominants pendant les moussons de Nord-est (à gauche) et de Sud-ouest (à droite) dans l’océan Indien (tiré de www.studyblue.com)	23
1.2	Historique des débarquements annuels des trois thons tropicaux de 1981 à 2014, par les thoniers senners sous pavillon européen, dans l’ouest de l’océan Indien. Les trois espèces sont capturées ensemble. BET= <i>Thunnus obesus</i> ; SKJ= <i>Katsuwonnus pelamis</i> ; YFT= <i>T. albacares</i> . Emprunté à Chassot et al. (2015).	24
1.3	Étapes d’une opération de pêche à la senne tournante © Pierre Lopez - IRD.	25
1.4	Les trois thons tropicaux: (a) <i>K. pelamis</i> , (b) <i>T. albacares</i> et (c) <i>T. obesus</i> . Images de iotc.org	26
1.5	Positions en section transverse des muscles rouge (partie grisée) et blanc (blanc) chez les thons, et exemple d’isothermes chez <i>T. obesus</i> dans le cas d’une température de l’eau de (A) 20.6°C et (B) 24.2°C. Emprunté à Carey et Teal (1966).	27
1.6	Illustrations des principales espèces consommées par les thons tropicaux dans l’ouest de l’océan Indien. A <i>Cupiceps pauciradiatus</i> , B <i>Diaphus metopoclampus</i> , C <i>Charybdis smithii</i> , D <i>Natosquilla investigatoris</i> , E <i>Sthenoteuthis oualaniensis</i> , F <i>Ornithoteuthis volatilis</i> . Images Wikimedia Commons modifiées, CC BY.	31
3.1	Formule topologique de (A) un triacylglycérol constitué d’un glycérol et de trois acides gras, en l’occurrence d’acides palmitiques (16:0); de (B) un type de phospholipide, en l’occurrence une phosphatidylcholine ou lécithine constituée d’une tête polaire (choline, phosphate, glycérol) et de deux acides gras: un acide oléique (18:1 ω 9) et un acide palmitique; (C) un stérol, en l’occurrence le cholestérol. Images Wikimedia Commons modifiées, CC BY-SA 3.0.	47
3.2	Schémas représentant l’organisation de (E) la bi-couche lipidique constituant les membranes cellulaires et (D) une lipoprotéine, permettant le transport de lipides dans la circulation générale. La structure des composés (A) triacylglycérol, (B) phospholipide et (C) stérol, est présentée dans la figure 3.1. Inspiré de Arts et Kohler (2009).	48
3.3	Voies de biosynthèses majeures des acides gras chez les animaux. Les flèches horizontales correspondent à une étape de désaturation (ajout d’une double liaison), celles verticales descendantes à une étape d’élongation (ajout de 2 carbones) et celle ascendantes à une étape de β -oxydation peroxisomale (suppression de 2 carbones). Les Δ indiquent les désaturases non (en rouge) ou peu (en bleu) actives chez les poissons marins. Modifié de Kelly et al. (2012). .	49

4.1	Origine géographique des 223 <i>T. obesus</i> (BET), 230 <i>T. albacares</i> YFT et 178 <i>K. pelamis</i> (SKJ) échantillonnés en 2013 au débarquement des thoniers senneurs au port de Victoria, Seychelles (indiqué par l'étoile).	56
4.2	Analyses effectuées à partir de chaque échantillon de tissu prélevé. En gris figurent les techniques d'analyses utilisées : BCA=dosage par l'acide bicinnoïque; Iatrosan=type de chromatographie en couche mince couplée à un détecteur à ionisation de flamme; GC-FID= chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme; IRMS=spectromètre de masse de ratios isotopiques; ASE=Extraction par solvant accélérée.	57
5.1	Relationship between bulk C:N ratio and total lipid content (% dw) for each tissue of yellowfin (YFT), skipjack (SKJ) and bigeye (BET). A curvilinear model was significant in white muscle only. Coefficients of determination (R^2) are given.	76
5.2	Lipid and protein composition (in % ww) of the white muscle, red muscle, liver and gonads of the three tropical tuna species. Reserve lipids refer to TriAcylGlycerol (TAG) and structural lipids to Phospholipids (PL). Gonad F=female gonads; Gonad M=male gonads; YFT=yellowfin; BET=bigeye; SKJ=skipjack.	78
5.3	Linear regression models between the Gonado-Somatic Index (GSI) and the lipid-free C:N ratio measured in gonads of males and females of the three tropical tuna species (YFT=yellowfin; SKJ=skipjack; BET=bigeye).	79
5.4	Distributions of the $\Delta\delta^{13}C_{\text{error}}$, i.e. the differences between the lipid-corrected and observed lipid-free $\delta^{13}C$ values in different tissues of tropical tuna. Lipid-corrected values were predicted from the three lipid-normalization models using a cross validation procedure that was repeated 500 times. $\Delta\delta^{13}C_{\text{error}} = \delta^{13}C_{\text{corrected}} - \delta^{13}C_{\text{lipid-free}}$	81
6.1	Location of skipjack tuna (SKJ), yellowfin tuna (YFT) and bigeye tuna (BET) caught in the Western Indian Ocean throughout 2013. The limit of the two study areas, Mozambique Channel (MOZ) and Western-Central Indian Ocean (WCIO), is indicated with a dashed line.	93
6.2	Scatterplots and associated convex hull of three-dimensional nonmetric multidimensional scaling (NMDS) using Euclidean distance matrix for neutral fatty acid profiles in the muscle of skipjack tuna (SKJ), yellowfin tuna (YFT) and bigeye tuna (BET) caught in the Western-Central Indian Ocean (WCIO), according to size class: (a) fish with fork length less than 100 cm ($FL \leq 100$ cm) and (b) fish with fork length higher than 100 cm ($FL > 100$ cm). Arrows are significant variables ($P < 0.05$) correlated with the ordination. Dim: dimension.	100
6.3	Two-dimensional scaled isotopic space ($\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$) in the muscle and liver of skipjack tuna (SKJ), yellowfin tuna (YFT) and bigeye tuna (BET) caught in the Western-Central Indian Ocean (WCIO), according to size class: (a) fish with fork length less than 100 cm ($FL \leq 100$ cm), (b) fish fork length higher than 100cm ($FL > 100$ cm).	101

6.4	Smother plots illustrating the relationship between observed fork length (FL) and GAM predicted values for (a) the main fatty acid (FA) families (b) six individuals neutral fatty acid (NFA) of which five are essential(DHA, EPA, AA, 18:3 ω 3 and 18:2 ω 6) in the liver of BET and YFT sampled in the Western-Central Indian Ocean throughout 2013. Vertical dashed lines represent the size at which a proportion change in the main FA families occurs (91 and 109 cm FL for BET and YFT respectively). Solid areas showed the confidence interval (1.96*standard error) around the predicted value (line). Short vertical lines on the x-axis represent the sampled values; BET: Bigeye; SKJ: Skipjack; YFT: Yellowfin; EPA: Eicosapentaenoic acid (20:5 ω 3); DHA: Docosahexaenoic acid (22:6 ω 3); AA: Arachinoic acid (20:4 ω 6).	102
6.5	Smother plots illustrating the relationship between observed fork length (FL) and GAM predicted values for stables isotopes values ($\delta^{13}\text{C}$ in blue and $\delta^{15}\text{N}$ in black) in (a) liver and (b) muscle of bigeye (BET), yellowfin (YFT) and skipjack (SKJ) from Western-Central Indian Ocean. Solid areas showed the confidence interval (1.96*standard error) around the predicted value (line). Short vertical lines on the x-axis represent the sampled values.	103
7.1	Location of bigeye (BET), skipjack (SKJ) and yellowfin (YFT) caught in the Western Indian Ocean throughout 2013 and analyzed for biochemical content. The limit of the two study areas, Mozambique Channel (MOZ) and Western-Central Indian Ocean (WCIO) is indicated with dashed line. Star indicates Mahé Island (Seychelles).	120
7.2	Relationships between the gonado-somatic index (GSI) and (A) lipid content, and (B) protein content measured in ovary (black symbols) and testis (grey symbols) of bigeye tuna (BET), skipjack tuna (SKJ) and yellowfin tuna (YFT) collected throughout 2013 in the Western Indian Ocean. Lipid and protein content are expressed in mg.g^{-1} ww.	127
7.3	Relationships between measured lipid (left panel) and protein (right panel) contents in white (top panel) and red (bottom panel) muscles (together making up somatic body) of three tropical tuna from the Western Indian Ocean and predicted somatic biochemical values from empirical models based on fish size and somatic weight. Dashed line is the 1:1 line. Models' details are given in 'statistical analyses' section. BET=bigeye, SKJ=skipjack, YFT=yellowfin.	128
8.1	Location of bigeye (BET), skipjack (SKJ) and yellowfin (YFT) caught in the Western Indian Ocean in 2013 and analyzed for fatty acid compositions. The limit of the two studied areas, Mozambique Channel (MOZ) and Western-Central Indian Ocean (WCIO) is indicated with dashed line. Star indicates Victoria port, Seychelles.	136
8.2	Boxplots of the concentrations (in mg.g^{-1} ww) of polar (PL) and neutral (NL) lipids in four tissues (gonads, liver, red and white muscles) of three tropical tunas (BET=bigeye; SKJ=skipjack; YFT=yellowfin) caught in 2013 in the Western Indian Ocean. The dots represent outliers.	138
8.3	Principal component analyses of neutral and polar fatty acids' percentage composition for four tissues of three tropical tuna (BET= bigeye; SKJ=skipjack; YFT=yellowfin) sampled in the Western Indian Ocean during 2013. Only fatty acids with $\cos^2 > 0.35$ were represented to improve the reading.	140

8.4	Boxplots of some individual FA proportions in polar lipids (PL) of gonads (G; n=45, 49 and 43 in BET, SKJ and YFT respectively), liver (L; n=50, 55 and 49), red muscle (R; n=55, 59 and 54), white muscle (W; n=53, 59 and 54) in three tropical tunas from the Western Indian Ocean (BET, bigeye; SKJ, skipjack; YFT, yellowfin). The dots represent outliers.	142
8.5	Differences between 20:4n-6 percentages in neutral lipids (NL) and polar lipids (PL) according to size, in the white muscle of three tropical tunas from the Western Indian Ocean (BET, bigeye; SKJ, skipjack; YFT, yellowfin). Above the dashed line, ARA levels were higher in NL than in PL and below they were higher in PL. The dashed ellipse indicates large YFT with levels of 20:4n-6 particularly higher in PL than in NL.	144
9.1	Compositions isotopiques moyennes en azote et carbone, après délipidation chimique au dichlorométhane, de quatre tissus provenant de trois thons tropicaux (<i>T. obesus</i> , <i>K. pelamis</i> et <i>T. albacares</i>) de l'Ouest de l'océan Indien.	152
9.2	Relation entre le contenu énergétique du muscle et l'indice de condition de Le Cren (K_n) chez la morue <i>Gadus morhua</i> observée par Lambert et Dutil (1997). Les pointillés orange figurent la gamme de variation de ce même indice observée chez les thons tropicaux dans notre étude.	154
9.3	Proportions relatives en lipides et protéines (mg.g ⁻¹) dans les quatre tissus étudiés chez les thon tropicaux. Les flèches en pointillées indiquent des hypothèses concernant les échanges de lipides et acides gras entre tissus. Notez que la proportion de protéines a été divisée par 10 pour améliorer la lisibilité de la figure. BET= <i>T. obesus</i> ; SKJ= <i>K. pelamis</i> ; YFT= <i>T. albacares</i> ; ARA=Acide arachidonique; DHA=Acide docosahexaénoïque; EPA=Acide eicosapentaénoïque; AGMI=Acides gras mono-insaturés; AGS=Acides gras saturés; AGPI=Acides gras poly-insaturés; Vtg=Vitellogénine; GSI=Indice gonado-somatique.	161

Liste des tableaux

1.1	Principaux traits d'histoire de vie des trois espèces de thon tropicaux dans l'océan Indien. La longévité observée est celle obtenue par des méthodes d'âgeage directes ou indirectes, alors que la longévité théorique est calculée selon l'approximation de Taylor (1958) et est basée sur les paramètres de croissance. Le terme <i>stances</i> réfère à un changement du rythme de croissance. L ₅₀ et L ₉₅ font références aux tailles auxquelles 50% et 95% de la population est sexuellement mature (au stade vitellogénique 2; voir Annexe A).	29
2.1	Liste non-exhaustive d'études portant des informations sur les stratégies d'allocations d'énergie chez les thons tropicaux par différentes approches : Caractéristiques de l'espèce ; Traits de vie des populations et Composition proximale. Pour chaque approche, les références sont données par ordre chronologique. Certaines études proposent des comparaisons avec d'autres espèces non mentionnées ici. BET= <i>T. obesus</i> ; SKJ= <i>K. pelamis</i> ; YFT= <i>T. albacares</i> ; GSI=Indice Gonado-Somatique.	38
2.2	Liste non-exhaustive d'études portant des informations sur les stratégies d'allocations d'énergie chez les thons tropicaux par l'étude du métabolisme cellulaire ou individuel en conditions expérimentales. Les références sont données par ordre chronologique. Certaines études proposent des comparaisons avec d'autres espèces non mentionnées ici. BET= <i>T. obesus</i> ; SKJ= <i>K. pelamis</i> ; YFT= <i>T. albacares</i>	39
3.1	Principaux avantages et inconvénients scientifiques et techniques de l'analyse de la composition proximale (classes de lipides et protéines), en acide gras (AG) et en isotopes stables (IS). . . .	53
4.1	Les mesures morphométriques et somatiques relevées sur chaque thon échantillonné.	56
5.1	Non-exhaustive inventory of lipid-correction models from the literature and developed for marine organisms. Many studies compared different models using their data and are cited in the corresponding model type.	72
5.2	Mean values (\pm standard deviation) of total lipid content (% dw), isotopic data ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) and C:N ratios for bulk and lipid-free samples in the gonads (G), liver (L), red muscle (R) and white muscle (W) of tropical tuna (YFT=yellowfin; BET=bigeye; SKJ=skipjack) sampled in the Western Indian Ocean.	76
5.3	Results of the two chemical extractions performed successively on 40 samples: mean values (\pm standard deviation) of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values, and C:N ratio of bulk samples and after chemical extractions. Letters indicate significant differences ($p < 0.05$) based on Wilcoxon's test: a = different from bulk, b = different from first extraction.	77

5.4	Diagnostic statistics of the linear regression models with $\Delta\delta^{15}\text{N}$ and $\Delta\delta^{13}\text{C}$ as dependant variables, and lipid content, tissue, species and sex as explanatory variables. $\Delta\delta^{15}\text{N} = \delta^{15}\text{N}_{\text{lipid-free}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$ and $\Delta\delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_{\text{lipid-free}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}}$, i.e. the differences between the isotopic values of bulk and lipid-free samples.	79
5.5	Estimated parameter values ($\pm\text{SD}$) from our dataset of the three correction models that predict lipid-corrected $\delta^{13}\text{C}$ values in white (W) and red (R) muscles, liver (L) and gonads (G) of tropical tuna (see text).	80
5.6	Assessment of the prediction of the three models [eq1], [eq2], [eq3] using a cross validation procedure that was repeated 500 times, and in the two parameters' configuration: based on our dataset (Table 4) and based on published studies (see text). Paired Wilcoxon's tests were carried out for each model and at each trial to compare predicted ($\delta^{13}\text{C}_{\text{corr}}$) and observed ($\delta^{13}\text{C}_{\text{lipid-free}}$) values. Good predictions are expressed in % of acceptable p-values (i.e., % of p-values > 0.05) for the 500 iterations. Mean and maximum values of $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{error}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{corrected}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{lipid-free}}$ are specified.	80
6.1	Mean values ($\pm\text{standard deviation}$) of carbon and nitrogen isotopic data ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, ‰), total lipid content (% dw) and fatty acid profiles (neutral lipids as a % of total fatty acids) of the liver and muscle of skipjack tuna (SKJ), yellowfin tuna (YFT) and bigeye tuna (BET) in the Western-Central Indian Ocean, according to size class ($\text{FL} \leq 100$ cm and $\text{FL} > 100$ cm). N is the number of samples for SI and NFA analyses. Superscripts represent significantly $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, TLC and NFA differences among species ($P < 0.05$ for Wilcoxon's test): B different from BET; S different from SKJ; Y different from YFT.	95
6.2	ANOVA and PERMANOVA results of tests for differences in total lipid content (TLC, % dw), fatty acid profiles (neutral lipids as a % of total fatty acids), and nitrogen and carbon isotope values ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, ‰) in the muscle and liver of tropical tuna. Tested factors are season (NEM, SWM, SIM, AIM), area (WCIO or MOZ), size class ($\text{FL} \leq 100$ cm or $\text{FL} > 100$ cm), species (SKJ, YFT and BET) and their interactions when possible. NEM: North-Eastern Monsoon; SWM: South Western Monsoon; SIM: Spring Inter-Monsoon; AIM: Autumn Inter-Monsoon; WCIO: Western-Central Indian Ocean; MOZ: Mozambique channel; BET: Bigeye; SKJ: Skipjack; YFT: Yellowfin. df: freedom degree; sqs: squares, F and Pseudo F: statistics of the tests.	96
6.3	Biochemical trophic niches indices (INes for stable isotopes and FANes for neutral fatty acids profiles) calculated for small (≤ 100 cm) and large tuna (> 100 cm), in Western-Central Indian Ocean (WCIO) and Mozambique Channel (MOZ) separately. Values correspond to the degree of overlap among species with 0 = no overlap and 1 = complete overlap. BET: Bigeye; SKJ: Skipjack; YFT: Yellowfin.	99
6.4	Number of tuna individuals (n) analyzed for stable isotopes and neutral fatty acid, in each group (size class, sex, season, area and maturity). BET: Bigeye; SKJ: Skipjack; YFT: Yellowfin; I: indeterminate; F: female; M: male; AIM: Autumn Inter-Monsoon; NEM: North-Eastern Monsoon; SIM: Spring Inter-Monsoon; SWM: South Western Monsoon; WCIO: Western-Central Indian Ocean; MOZ: Mozambique Channel; Dev.: Developing phase; Spa.: Spawning capable phase.	110

6.5	Statistics of F-test for each species and tissue of generalized additive models selected by Akaike Information Criterion (AIC) on isotopic values of nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) and carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and total lipid content (TLC). BET: Bigeye; SKJ: Skipjack; YFT: Yellowfin; Y: Variable to explain; df: degree of freedom; edf: estimated degree of freedom for smoothed terms expressed as $s()$. Significant influences of terms are in bold.	111
6.6	Statistics of F-test for each species and tissue of generalized additive models selected by Akaike Information Criterion (AIC) on (a) Neutral fatty acid (NFA) profiles summarized through non-metric multidimensional scaling coordinates (Dimension 1, Dimension 2 and Dimension 3), (b) Main NFA families when a significant size influence was detected in (a). BET: Bigeye; SKJ: Skipjack; YFT: Yellowfin; Y: Variable to explain; df: degree of freedom; edf: estimated degree of freedom for smoothed terms expressed as $s()$. Significant influences of terms are in bold.	112
6.7	Mean values (\pm standard deviation) of carbon and nitrogen isotopic data ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, ‰), total lipid content (% dw) and fatty acid profiles (neutral lipids as a % of total fatty acids) of the liver and muscle of skipjack tuna in the Western-Central Indian Ocean, according to gender. N is the number of samples for SI and NFA analyses.	113
7.1	Biometric and biochemical indices and their respective formulas used in the present study. W_{std} is the somatic weight predicted for each individual given its F_L and according to the population Length-Somatic weight relationship (see Table 7.2 for parameters).	121
7.2	Parameter estimates (mean \pm standard deviation) of the Length-Somatic weight relationships, using the least squares estimates, for tropical tunas from the Western Indian Ocean: $W_{\text{std}} = a \times F_L^b$ with W_{std} the somatic weight (in kg) and F_L the fork length (in cm). n give the number of individuals used.	121
7.3	Protein and lipid contents, and levels in two lipid classes, TriAcylGlycerols (TAG) and Sterols (ST) of the gonads, liver, red and white muscles of bigeye tuna (BET), skipjack tuna (SKJ) and yellowfin tuna (YFT) from the Western Indian Ocean. Values are expressed in mg.g^{-1} ww and reported in mean \pm standard deviation. n give the number of samples analyzed for proteins/lipids (i.e. both lipid content and lipid classes).	123
7.4	Results of multiple regression analyses (F-tests) and associated t-tests performed in four tissues (gonads, liver, red and white muscles) to detect the relative influence of biological (species: BET, SKJ, YFT; size noted as F_L ; sex: In, F, M; and maturity: Dev. or Spa.) and environmental (seasons: NEM, SWM, AIM, SIM; and area: MOZ and WCIO) variables on (a) protein content and (b) lipid content (see 7.3.1 for modality details).	124
7.5	Size (F_L , cm) and biometric indices (condition factors: Kn and T_G/F_L ; gonado- and hepato-somatic indices, GSI and HSI respectively) recorded in the Western Indian Ocean during 2013 for bigeye tuna (BET), skipjack tuna (SKJ) and yellowfin tuna (YFT).	125
7.6	Spearman correlation tests between biometric indices (condition factors: Kn and T_G/F_L ; gonado- and hepato-somatic indices, GSI and HSI respectively) and biochemical characteristics (total fat and protein contents in mg.g^{-1} ww; TAG/ST ratio; total energy density in kJ.g^{-1} ww) of four tissues of tropical tuna from the Western Indian Ocean. Significant correlations are in bold; ρ correlation coefficients over 0.5 are in bold-italic. BET=bigeye tuna, SKJ=skipjack tuna, YFT=yellowfin tuna.	126

7.7	P-values of paired Wilcoxon's tests comparing predicted somatic lipid and protein contents and those measured in white and red muscles (together making up somatic body) of tropical tunas from the Western Indian Ocean. Mean and maximum (noted 'max.')	errors in prediction and Root Mean Squared Errors (RMSE) are expressed in $mg.g^{-1}$ ww.	127
8.1	Sampling design showing the number, the size and the gonado-somatic index (GSI) of tuna sampled in the Western Indian Ocean throughout 2013 and analyzed for fatty acids composition. BET: Bigeye; SKJ: Skipjack; YFT: Yellowfin; AIM: Autumn Inter-Monsoon; NEM: North-Eastern Monsoon; SIM: Spring Inter-Monsoon; SWM: South Western Monsoon; WCIO: Western-Central Indian Ocean; MOZ: Mozambique Channel.		137
8.2	Fatty acid composition (in % of total fatty acids in a given fraction) and fatty acid ratios (mean \pm SD of the total dataset) in neutral and polar lipids from four tissues (gonads, liver, red and white muscle) of three tropical tuna from the Western Indian Ocean. GSI=Gonado-somatic index. SFA: saturated fatty acids; MUFA: Monounsaturated fatty acids; PUFA: Polyunsaturated fatty acids. N=number of tissues analyzed for both neutral and polar lipids.		139
8.3	F-test results for analysis of the influence of various factors (species, size and their interaction, GSI, sex, season, area) on six FA (22:6n-3, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:5n-6, 18:0 and 18:1n-9) from the polar lipids (PL) in four tissues of three tropical tuna from the Western Indian Ocean. F=statistic of the test; p=p-value. GSI=Gonado-somatic index.		141
8.4	F-test results for analysis of the influence of various factors (species, size and their interaction, GSI, sex, season, area) on six FA (22:6n-3, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:5n-6, 18:0 and 18:1n-9) from the neutral lipids (NL) in four tissues of three tropical tuna from the Western Indian Ocean. F=statistic of the test; p=p-value. GSI=Gonado-somatic index.		145

Contexte général

Face à la crise de biodiversité que traverse notre planète, parfois nommée sixième grande extinction et dont la cause première apparaît être l'explosion démographique humaine et ses activités connexes (De Wever and David, 2015), la Communauté Européenne s'est engagée à stopper cette perte de biodiversité. Concernant le milieu marin, l'Europe s'est donc dotée en 2008 d'une Directive-cadre "stratégie pour le milieu marin" (2008/56/CE) dont l'objectif est le "bon état écologique" du milieu marin d'ici à 2020. Plusieurs indicateurs de ce bon état ont été sélectionnés, parmi eux le bon état de santé des stocks exploités faisant appel à un panel d'indicateurs (de la biomasse du stock à la proportion d'individus matures en passant par la stabilité des relations prédateurs-proies). Ces préoccupations concernent notamment les thons tropicaux puisqu'ils sont massivement pêchés et que des situations de sur-pêche sont aujourd'hui observées dans l'océan Indien (IOTC, 2015d), où sont capturés environ 20% des thons tropicaux à échelle mondiale. Afin d'améliorer la gestion de ces espèces, le développement d'outils pour estimer l'état de santé des individus est nécessaire. Cependant, afin de proposer de tels indicateurs, il apparaît indispensable de bien comprendre les mécanismes biologiques et écologiques sous-jacents qui les influencent.

L'organisation de ce mémoire suit le plan suivant : une partie introductive, constituée d'un premier chapitre qui présente les thons tropicaux dans l'océan Indien, et d'un second qui présente une synthèse des approches utilisées pour étudier les mécanismes d'allocation d'énergie chez les poissons, puis les objectifs de la thèse. La deuxième partie de ce travail présente l'approche "multi-tissu et multi-traceurs" utilisée (chapitre 3), et les protocoles d'analyses (chapitre 4). La troisième partie se compose de quatre chapitres correspondant aux axes d'étude suivis : le chapitre 5 est d'ordre méthodologique en vue de l'étude trophique à venir (article publié: Sardenne et al., 2015b). Le chapitre 6 traite de l'écologie trophique des thons tropicaux, de manière à déterminer les différences alimentaires inter-spécifiques et ontogéniques (article soumis); le chapitre 7 s'attache à évaluer les contenus énergétiques des tissus et la capacité des indices de condition à en rendre compte (article soumis), et le chapitre 8 s'intéresse aux lipides essentiels pour le métabolisme des thons tropicaux (article soumis). Enfin, ce mémoire se termine par une partie de discussion générale sur les aspects méthodologiques abordés, sur la répartition d'énergie chez les thons tropicaux et sur leurs relations trophiques.

Partie I

Contexte bibliographique

Chapitre 1

Les thons tropicaux de l'océan Indien

1.1 L'Ouest de l'océan Indien et la pêche thonière

1.1.1 Spécificités environnementales

L'océan Indien est le plus petit des océans mondiaux (75 000 000 km²). Sa proximité avec de nombreuses masses continentales est à l'origine du phénomène des moussons, résultant de l'inversement du flux thermique et donc des vents dominants entre les hémisphères nord et sud (Fig. 1.1). Ainsi, deux périodes de moussons (d'environ 4 mois), la mousson de Nord-est (de mi-novembre à mi-mars) et la mousson de Sud-ouest (de mi-mai à mi-septembre), alternent avec deux périodes d'inter-moussons plus courtes (environ 2 mois chacune). Comme beaucoup de zones hauturières tropicales, l'océan Indien est plutôt oligotrophe au large (Longhurst, 1995).

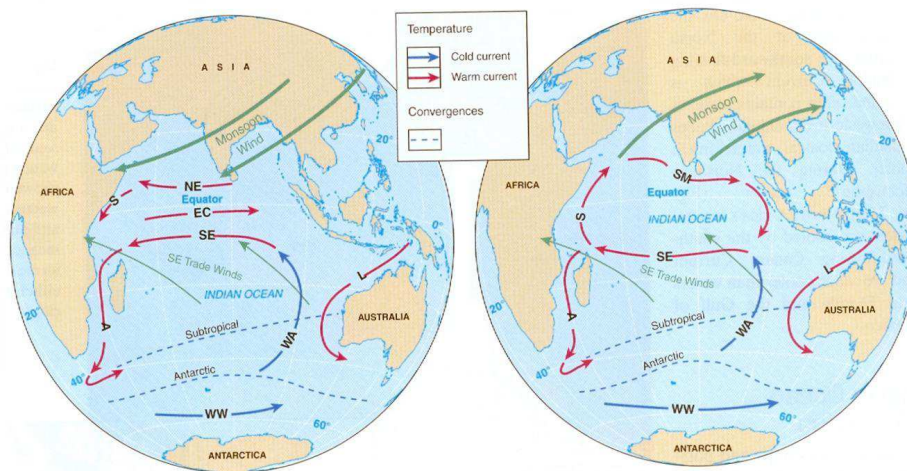


Fig. 1.1: Direction des vents (en vert) et courants (chaud en rouge et froid en bleu) dominants pendant les moussons de Nord-est (à gauche) et de Sud-ouest (à droite) dans l'océan Indien (tiré de www.studyblue.com)

Des oscillations climatiques interannuelles, semblables au phénomène d'El Niño dans l'océan Pacifique, sont également observées dans l'océan Indien et nommées "dipôle de l'océan Indien". D'une fréquence d'environ quatre à cinq ans, les périodes d'anomalie positive de ce phénomène se caractérisent par une température de surface de l'eau anormalement basse au large de Sumatra mais élevée à l'ouest de l'océan

Indien, accompagnée de fortes précipitations et d'un abaissement de la thermocline à l'ouest du bassin (Saji et al., 1999). Les effets de ce phénomène peuvent être ressentis sur le phytoplancton (Currie et al., 2013), comme sur les débarquements de pêche thonière, en raison de l'abaissement de la thermocline (favorisant la dispersion en profondeur des thons) ou d'une possible diminution des proies lors du réchauffement de l'eau (Ménard et al., 2007b).

A l'ouest de l'océan Indien, le canal du Mozambique, bordé par la côte Est africaine et Madagascar, est une région particulière. Sa circulation océanique est contrainte par les structures de méso-échelle, notamment des nombreux tourbillons cycloniques et anticycloniques (Tew-Kai and Marsac, 2009; Béhagle et al., 2014). Ces tourbillons peuvent avoir un impact sur l'activité biologique, en concentrant ou au contraire en dissipant les nutriments nécessaires à la production primaire (Tew Kai and Marsac, 2010). Les effets sur la faune des niveaux trophiques supérieurs sont cependant difficiles à spécifier et peu de différences dans les structures trophiques ont été détectées entre les formations cycloniques et anticycloniques (Sabarros et al., 2009; Ménard et al., 2014; Potier et al., 2014). Cependant, les signatures isotopiques en azote d'organismes provenant du canal du Mozambique sont souvent plus faibles que celles du reste de l'ouest de l'océan Indien, suggérant un niveau de base du réseau trophique plus faible dans cette région, qui se propage ensuite dans les niveaux supérieurs (Ménard et al., 2007a; Jaquemet et al., 2008) et/ou des chaînes alimentaires de longueur différentes, car la bio-accumulation de certains métaux y est également différente (Kojadinovic et al., 2007).

1.1.2 Pêche thonière à la senne

Il existe une pêche thonière de zone côtière, artisanale et diversifiée, qui est pratiquée par l'ensemble des pays bordant l'océan Indien, et qui représente un peu plus de la moitié des captures de thons dans cet océan (Murua et al., 2015). Une pêcherie industrielle s'est développée dans le cadre d'accords de pêche entre ces pays et certains pays asiatiques (Japon, Taïwan) depuis les années 50 et l'Union Européenne depuis les années 80, autorisant la présence de senneurs et de palangriers. Dans l'ouest de l'océan Indien, les palangriers industriels débarquent environ 50 000 tonnes et les senneurs sous pavillon européen (principalement espagnol et français) débarquent aux alentours de 300 000 tonnes par an (Fig. 1.2), dans les ports Seychellois, Mauricien et Malgache (IOTC, 2015b). Les conserveries transforment la majorité de ces débarquements, qui sont ensuite exportés dans les pays européens principalement. Il existe également un marché japonais pour le thon surgelé, visant la transformation en sushi.

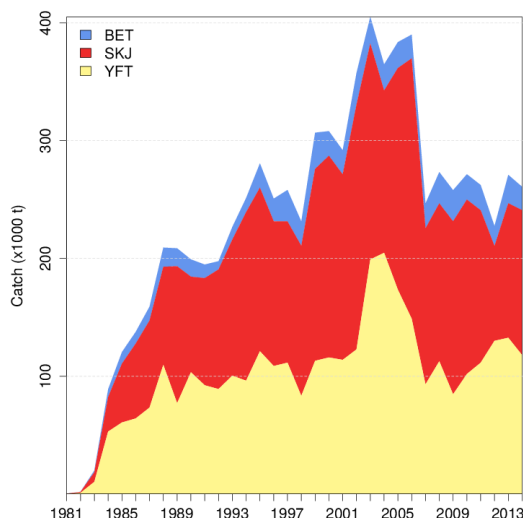


Fig. 1.2: Historique des débarquements annuels des trois thons tropicaux de 1981 à 2014, par les thoniers senneurs sous pavillon européen, dans l'ouest de l'océan Indien. Les trois espèces sont capturées ensemble. BET=*Thunnus obesus* ; SKJ=*Katsuwonnus pelamis* ; YFT=*T. albacares*. Emprunté à Chassot et al. (2015).

La pêche à la senne consiste à entourer le plus rapidement possible un banc de thons, préalablement détecté à l'aide de jumelles longue portée et de radars, avec un filet d'environ 1500 mètres de long sur 250 mètres de chute. Une fois le banc encerclé, le filet est refermé par le bas et son volume progressivement réduit (Fig. 1.3). L'ensemble des poissons est ensuite remonté à bord à l'aide d'une salabarde (grande épuisette), puis transféré dans des cales contenant de la saumure à -10°C . L'ensemble de l'opération de pêche dure en moyenne deux à trois heures.

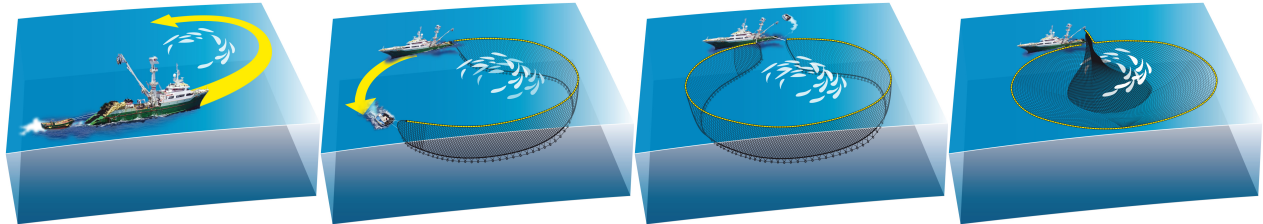


Fig. 1.3: Étapes d'une opération de pêche à la senne tournante © Pierre Lopez - IRD.

Dans l'ouest de l'océan Indien, les 39 thoniers senneurs sous pavillon européen font en moyenne 100 mètres de long et disposent de plusieurs cales (une douzaine le plus souvent) permettant une capacité de stockage totale de 600 à 2000 tonnes de poisson selon les bateaux (Chassot et al., 2015). Ces grandes capacités de stockage leurs permettent de pêcher au large pendant plusieurs semaines sans escale (autour de 4 à 6 semaines pour une demi-marée). Certains thoniers sont également accompagnés d'un navire de "support" leur fournissant informations et assistance, de manière à réduire le temps de recherche des poissons.

Pour faciliter la capture des thons, des objets flottants dérivants, couramment appelés Dispositifs de Concentration de Poissons (DCP) sont déployés par les senneurs. Il peut s'agir d'objets naturellement présents dans l'océan (i.e. troncs d'arbres, objets d'origine anthropique comme des palettes...) ou fabriqués spécifiquement pour la pêche (dits DCP artificiels) qui seront marqués d'une bouée GPS afin d'être suivis. Les DCP artificiels sont généralement des radeaux de bambou équipés de filets pendants pour réduire leur dérive due au vent et augmenter leur attractivité. En effet, ces DCP exploitent la tendance naturelle des poissons, et particulièrement celle des thons de petite taille, à se regrouper en large banc sous des objets flottants. Les raisons de cette attraction des thons pour les objets flottants sont encore mal comprises (e.g point de rencontre, évitement des prédateurs... voir Fréon and Dagorn, 2000; Girard et al., 2004) mais très largement mises à profit puisque depuis les années 2000 environ 60% des captures de thons sont faites sous DCP dans l'océan Indien (Chassot et al., 2015). Pourtant l'effet négatif des DCP sur la santé des stocks de poissons reste à ce jour difficile à évaluer (Robert et al., 2014; Dagorn et al., 2013) notamment à cause de l'absence de données sur l'état initial (i.e. avant l'introduction de DCP artificiels) et sur le temps de résidence des poissons sous les DCP dérivants. Un rôle de piège écologique des DCP est cependant suspecté (Hallier and Gaertner, 2008) et l'analyse des contenus stomacaux des thons sous DCP fait état de fortes proportions d'estomacs vides, suggérant que les DCP puissent parfois entraîner ou maintenir les thons, notamment ceux de petite taille, dans des zones pauvres en proies (Jaquemet et al., 2011). Un tel effet est suspecté d'impacter la croissance et la reproduction de certains thons (Zudaire et al., 2015; Costalago et al., soumis). Plus récemment, l'utilisation des DCP dérivants a provoqué la colère d'une organisation écologiste qui dénonce leur absence de sélectivité, et donc la capture puis le rejet de nombreuses espèces non-ciblées, parfois vulnérables, et de thons juvéniles. En effet, les bancs de thons sont structurés par la taille : si les thons de petite taille (i.e. $< 80\text{ cm}$) sont généralement capturés sous DCP en banc mixte (i.e. plusieurs espèces constituent le banc), les thons de large taille (i.e. $> 100\text{ cm}$) sont généralement capturés en banc libre, bien

qu'ils puissent aussi être associés aux DCP. Les tailles intermédiaires (i.e. 80-100 cm) sont en revanche peu présentes dans les débarquements de pêche industrielle. Il existe également des DCP ancrés à proximité des côtes, qui sont plutôt utilisés par les pêcheurs artisanaux et pour lesquels le temps de résidence des thons a été estimé entre quelque jours à plus d'un mois (Dagorn et al., 2006b).

Dans l'océan Indien, les stocks de thons sont gérés par la Commission des Thons de l'Océan Indien (CTOI/IOTC), qui jusqu'à présent n'émettait pas de quotas restrictifs pour les débarquements de thons tropicaux, puisque ces stocks étaient considérés comme en bonne santé. Seule une limite maximale de 550 DCP dérivants par sennear a été imposée en mai 2015 (IOTC, 2015c). Mais depuis la dernière évaluation du stock de thon jaune par la CTOI fin 2015, ce dernier est considéré comme sur-pêché (IOTC, 2015d), sans qu'une restriction des captures ne soit imposée à ce jour.

1.2 Biologie et écologie des thons tropicaux

Au niveau mondial, les thons tropicaux sont présents dans tous les océans, avec des affinités tropicales à sub-tropicales. Le choix d'étude des trois espèces de thons tropicaux, la bonite à ventre rayé (*Katsuwonus pelamis* ; SKJ), le thon jaune (*Thunnus albacares* ; YFT) et le thon obèse (*T. obesus* ; BET) (Fig. 1.4), est basé sur leur écologie, puisque ces trois espèces sont sympatriques et sont donc régulièrement capturées par les senneurs en bancs mixtes structurés par la taille (Fig. 1.2 ; Chassot et al., 2015). Cependant ces espèces présentent des caractéristiques différentes, aussi bien d'un point de vue phylogénique, physiologique, que de leurs traits d'histoire de vie.



Fig. 1.4: Les trois thons tropicaux: (a) *K. pelamis*, (b) *T. albacares* et (c) *T. obesus*. Images de iotc.org

1.2.1 Phylogénie et particularités physiologiques

Sur la base de leur morphologie, ces trois thons appartiennent à la famille des Scombridae, à la sous famille des Scombrinae et à la tribu des Thunnini (Collette et al., 2001). Cependant, d'un point de vue moléculaire, des études portant sur l'ADN mitochondrial révèlent l'existence de deux clades, distinguant également le genre *Thunnus* du genre *Katsuwonus* (Chow and Kishino, 1995; Alvarado Bremer et al., 1997).

Ces espèces ont en commun un type de nage particulier auquel ils ont donné leur nom : la nage thuniforme, basée sur la propulsion et limitant les ondulations latérales (Syme and Shadwick, 2002). Cette nage implique de nombreuses adaptations physiologiques dont, notamment, l'endothermie régionale et un métabolisme aérobie élevé. L'endothermie régionale est la capacité d'un organisme à élever localement sa température corporelle au dessus de celle de l'eau, et elle n'est observée que chez certains poissons dont les Scombridae, Xiphiidae et Lamnidae (éla-smobran-ches) (Bernal et al., 2001; Graham and Dickson, 2004). Elle permet une activité métabolique plus soutenue que chez les poissons ectothermes, puisque de nombreuses fonctions biologiques comme la production d'ATP, l'efficacité du nerf optique ou d'enzymes digestives dépendent de la température (Carey et al., 1984; Dickson 1996).

Cette élévation de la température, jusqu'à environ 10°C au dessus de celle de l'eau (Carey and Teal, 1966; Boye et al., 2009), a principalement lieu au centre du corps le long de la colonne vertébrale (Fig. 1.5). Afin de limiter les pertes d'énergie, le maintien de la chaleur vers l'intérieur du corps est assuré par le *rete mirabile*, un réseau de capillaires sanguins dont la grande surface de contact permet le transfert de chaleur et donc son maintien au centre de l'organisme (Holland et al., 1992; Dewar et al., 1994; Boye et al., 2009). Ce système est également observé chez les mammifères marins, et sa performance permet de réduire la proportion de muscle rouge nécessaire à l'endothermie (Graham et Dickson 2004). Chez les thons, le développement de ce système avec la taille permet en parallèle une diminution de la proportion de muscle rouge (Graham et al., 1983).

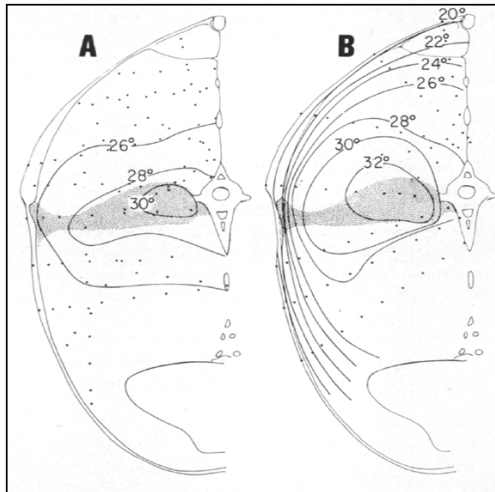


Fig. 1.5: Positions en section transverse des muscles rouge (partie grisée) et blanc (blanc) chez les thons, et exemple d'isothermes chez *T. obesus* dans le cas d'une température de l'eau de (A) 20.6°C et (B) 24.2°C. Emprunté à Carey et Teal (1966).

D'un point de vue métabolique, la nage consomme beaucoup d'énergie chez les thons puisqu'elle est obligatoire notamment pour la respiration. En effet les thons ne peuvent pas pomper l'eau au niveau de leurs branchies avec des mouvements de la mâchoire inférieure et de l'opercule, et doivent donc nager de manière à appliquer une pression suffisante au niveau des branchies pour permettre l'extraction de l'oxygène (Bushnell and Jones, 1994). D'autre part, ils ont de petites (*T. albacares* et *T. obesus*) voire aucune (*K. pelamis*) vessies natatoires, les rendant plus denses que l'eau de mer et leur imposant un mouvement permanent pour maintenir un équilibre hydrostatique (Magnuson, 1973). Les muscles rouge et blanc se répartissent cette fonction de nage : le muscle rouge est sollicité en permanence pour la nage de routine. Composé de nombreuses mitochondries, son métabolisme est lipidique (George and Stevens, 1978; Hulbert et al., 1979). A l'inverse, le muscle blanc est sollicité pour la nage rapide, lors d'accélération notamment, et son métabolisme est principalement glucidique (basé sur le glycogène). Lors d'une nage intense, ce muscle est capable de fonctionner temporairement en anaérobie, et produira donc des lactates (issus de la dégradation des glucides). Ces deux muscles ont des capacités remarquables, puisqu'ils permettent aux thons des pointes de vitesse à plus de 75 km.h⁻¹, mais ils nécessitent de forts apports en oxygène, qui sont assurés par de grandes surfaces branchiales (Wegner et al., 2009). D'autre part, la nage étant obligatoire chez les thons, les dépenses énergétiques qu'elle implique viendront s'ajouter à celles des autres fonctions biologiques (e.g. croissance, reproduction) mais ne pourront s'en soustraire (Korsmeyer and Dewar, 2001).

D'autres adaptations physiologiques ont également été observées chez les thons. L'efficacité du transport de l'oxygène est ainsi assurée à la fois par les caractéristiques particulières d'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène (O₂), un hémocrite élevé (taux de globules rouges dans le sang) et un cœur puissant (Brill and Bushnell, 2001; Swimmer et al., 2005).

Si toutes ces adaptations sont caractéristiques des thons, chaque espèce présente cependant des spécificités.

Par exemple, en proportion, les surfaces branchiales de *K. pelamis* sont supérieures à celles de *T. albacares* (1846 et 1327 mm².g⁻¹ respectivement, Wegner et al., 2009), et dans les mêmes conditions de température, le métabolisme standard est plus consommateur en O₂ chez *K. pelamis* que chez *T. albacares* (824 et 476 ml O₂.kg⁻¹.h⁻¹ respectivement, Bushnell and Jones, 1994). L'affinité de l'hémoglobine pour l'O₂ et l'effet Bohr (affinité pour le CO₂ favorisant la libération d'O₂ dans les tissus), qui améliorent la résistance à l'hypoxie, sont en revanche plus élevés chez *T. obesus* que chez *T. albacares* et *K. pelamis* (Lowe et al., 2000). Enfin, avec une plus grande proportion de *rete mirabile*, la thermorégulation est une caractéristique plus développée chez *T. obesus* que chez *K. pelamis* notamment (Holland et al., 1992). Il est toutefois intéressant de noter que Swimmer et al. (2005) ne trouvent aucune différence d'activités enzymatiques dans le cœur des trois espèces pouvant expliquer des écarts de tolérance à l'hypoxie et à la température.

1.2.2 Distribution verticale

Les aires de répartition géographique et les distributions verticales des thons tropicaux sont conditionnées en partie par leurs particularités physiologiques, notamment en termes de tolérance au manque d'oxygène : les zones de minimum d'oxygène et donc la profondeur de la thermocline sont autant de contraintes physiques pour ces espèces. En effet, l'optimisation des performances physiologiques dépend directement des gammes de tolérance de chaque espèce, car en dehors de ces gammes le métabolisme sera plus consommateur en énergie. Ainsi *K. pelamis* trouve son optimum environnemental dans les eaux de surfaces (0-200 m) où la température est comprise entre 15 °C et 26 °C avec une concentration en oxygène autour de 5 ml.l⁻¹. Mais chez cette espèce, les besoins en oxygène augmentent fortement avec la taille (difficulté à refroidir le corps, Brill, 1994), de sorte que les gros individus (>9 kg) sont plus confinés que les petits individus et tolèrent mal les eaux de température supérieure à 22 °C (Barkley et al., 1978). Certains enregistrements de plongée dans le Pacifique ont montré que cette espèce pouvait plonger à 600 m de profondeur (Schaefer and Fuller, 2007). De son côté, *T. albacares* tolère des valeurs plus faibles, avec un optimum autour de 15 °C et 3.5 ml.l⁻¹ d'oxygène, que l'on rencontre autour de 100 m de profondeur en zone équatoriale, et au-delà aux plus hautes latitudes (15-20 °S). Enfin, *T. obesus* tolère des eaux plus tempérées aux températures inférieures à 7 °C et aux concentrations en oxygène proches de 1.5 ml.l⁻¹ (Brill et al., 2005). Les tolérances environnementales de ces deux dernières espèces, en termes de température et oxygène, leur permettent d'exploiter un habitat vertical beaucoup plus important, notamment aux grandes tailles. Ainsi, les records de plongée enregistrés avec des marques archives atteignent plus de 1000 m de profondeur pour *T. albacares* (Dagorn et al., 2006a; Schaefer et al., 2011) et plus de 1800 m pour *T. obesus* (Schaefer and Fuller, 2006). La thermorégulation partielle leur permet en effet un maintien d'efficacité du nerf optique et ainsi de voir correctement à ces profondeurs (Graham and Dickson, 2004). Cependant aux jeunes stades, *T. albacares* comme *T. obesus* restent plutôt dans les eaux de surface (50-200 m de profondeur), généralement en banc mixte avec *K. pelamis*.

1.2.3 Différentes histoires de vie

Les traits de vie des trois thons tropicaux semblent globalement similaires lorsqu'ils sont comparés à ceux des thons tempérés (e.g. croissance rapide, âge à maturité précoce, Fromentin and Fonteneau 2001), pourtant ils n'en restent pas moins assez différents. Le tableau 1.1 présente une liste non-exhaustive des différences observées entre *T. obesus*, *T. albacares* et *K. pelamis*. Il est à noter que les thons sont des espèces gonochoriques sans dimorphisme sexuel connu. Seule l'inspection visuelle des gonades suffisamment développées permet de déterminer le sexe des individus.

Table 1.1: Principaux traits d’histoire de vie des trois espèces de thon tropicaux dans l’océan Indien. La longévité observée est celle obtenue par des méthodes d’ageage directes ou indirectes, alors que la longévité théorique est calculée selon l’approximation de Taylor (1958) et est basée sur les paramètres de croissance. Le terme *stances* réfère à un changement du rythme de croissance. L_{50} et L_{95} font références aux tailles auxquelles 50% et 95% de la population est sexuellement mature (au stade vitellogénique 2; voir Annexe A).

		<i>K. pelamis</i>	<i>T. albacares</i>	<i>T. obesus</i>	Références
Age et croissance	Taille max. obs. (cm)	111	231	236	Juan-Jordá et al., soumis
	Longévité (an)				
	- observée	6	9	16	Juan-Jordá et al., soumis
	- théorique	15	22	54	
	Croissance	von Bertalanffy	2 stances	2 stances	Eveson et al. (2015) Dortel et al. (2015)
Reproduction et fécondité	L_{50} (cm)	40	75	100*	Grande et al. (2014)
	L_{95} (cm)	55	100	130*	Zudaire et al. (2013)
					Farley et al. (2006)*
	Stratégie de reproduction	income breeder ¹	income-capital breeder ²	?	Grande et al. (2013) Zudaire et al. (2013)
	Saison de reproduction	toute l’année	Nov.-Mars + Juin	Nov.-Mars ?	Grande et al. (2013) Zudaire et al. (2013)

* estimations pour l’océan Pacifique

¹ le coût énergétique associé à la reproduction est entièrement assuré par l’alimentation en période de reproduction.

² le coût énergétique associé à la reproduction est assuré par l’alimentation et un stockage préalable d’énergie.

Bien que les méthodes d’estimation des paramètres de croissance ne convergent pas toujours, un programme de marquage mis en place dans l’Ouest de l’Océan Indien de 2005 à 2012 par la CTOI (Murua et al., 2015) a cependant permis d’obtenir des estimations pour cette zone. Ainsi, *T. albacares* et dans une moindre mesure *T. obesus*, présentent une croissance en deux stances avec une accélération de croissance passant de 0.2 à 1.5 cm.jour⁻¹ après 68 cm (soit à environ 2.5 ans) pour le premier et passant de 0.1 à 0.5 cm.jour⁻¹ après 60 cm (soit à environ 2.2 ans) pour le second (Dortel et al., 2015; Eveson et al., 2015). Ces taux de croissance semblent donc indépendants de l’acquisition de la maturité sexuelle, qui est plus tardive chez ces deux espèces : autour de 75 et 100 cm respectivement. Des différences de croissance entre sexes sont également observées chez ces deux espèces, les mâles devenant généralement plus grands que les femelles (Eveson et al., 2015). En revanche *K. pelamis* présente une croissance plus classique, de type von Bertalanffy : rapide jusqu’à 46 cm (soit pendant environ 10 mois) puis qui ralentit progressivement (passant 1.4 à 0.4 cm.jour⁻¹, Eveson et al., 2015), mais aucune information sur des différences entre sexes n’est disponible pour cette espèce.

Enfin, peu de données sont actuellement disponibles sur la stratégie de reproduction et la taille à maturité de *T. obesus* dans l’Ouest de l’océan Indien (la taille à maturité donnée dans le tableau 1.1 est celle estimée pour l’océan Pacifique sur la base d’inspection macroscopique des gonades, et non microscopique comme c’est le cas pour les deux autres espèces).

1.2.4 Écologie trophique

Plusieurs études trophiques ont été menées jusqu’à ce jour sur les thons tropicaux, incluant principalement des analyses de contenus stomacaux et des analyses des isotopes stables du carbone et de l’azote. Ces études ont caractérisé un comportement opportuniste des thons, se nourrissant aussi bien de petits poissons, que de crustacés ou de céphalopodes, avec une sélection des proies basée principalement sur la disponibilité (Ménard et al., 2006).

Dans l’océan Indien, un changement de régime alimentaire est observé autour des années 2000, avec des crustacés devenus des proies majoritaires alors que les poissons épipélagiques dominaient historiquement le régime alimentaire des thons (Roger, 1994). Un phénomène similaire est observé dans l’océan Pacifique, et Olson et al. (2014) imputent ce changement à la conjoncture de plusieurs facteurs : la réduction de la production biologique et en particulier de la taille des cellules de phytoplancton et l’extension verticale des zones d’anoxie, sans pour autant exclure l’effet d’une diminution de certaines proies des thons, notamment d’*Auxis spp.*, lié à l’augmentation de leur pêche.

Malgré leur comportement opportuniste, les régimes alimentaires des thons tropicaux ne sont pas strictement identiques : les crustacés, principalement *Charybdis smithii* et *Natosquilla investigatoris* ainsi que les petits poissons comme *Cupiceps pauciradiatus* sont les proies principales des thons capturés en surface, quelque soit l’espèce (Potier et al., 2001, 2004; Grande 2012; Zudaire et al., 2015) (Fig. 1.6). Les céphalopodes, notamment *Sthenoteuthis oualaniensis* et *Ornithoteuthis volatilis*, composent aussi les régimes alimentaires de *T. albacares* et *T. obesus* (Potier et al., 2001; Ménard et al., 2013), dont la proportion augmente généralement avec la profondeur de l’habitat. Ainsi, les gros thons capturés à la palangre (i.e. plus en profondeur que ceux pêchés à la senne tournante) ont en proportion plus de céphalopodes dans leurs estomacs que les thons de surface (Potier et al., 2004). Ce comportement opportuniste des thons leur confère un niveau trophique moyen, estimé autour de 4 (Popp et al., 2007; Lorrain et al., 2015). Un détail des compositions isotopiques et lipidique des principales proies des thons peut être trouvé en Annexe B.

D’autre part, les heures de chasse seraient sensiblement différentes entre les trois thons. Dans l’océan Atlantique, Cayre et al. (1988) font une synthèse des études portant sur les thons tropicaux entre les années 60 et 70, et concluent que *K. pelamis* se nourrit activement au crépuscule mais pas la nuit ; que *T. albacares* se nourrit principalement au crépuscule et en moindre mesure en journée et, finalement, que *T. obesus* se nourrirait au crépuscule et pendant la nuit. Des résultats similaires ont été obtenus dans le Pacifique ouest par Young et al. (2010b) pour *T. albacares* et *T. obesus*. Cependant, Schaefer and Fuller (2004) notent la possibilité pour *K. pelamis* de se nourrir aussi la nuit. En ce sens, dans l’océan Indien, Grande (2013) note que le taux d’estomacs vides (ou de bol alimentaire en état de dégradation avancée) de *K. pelamis* proche de DCP dérivant est élevé (77 %, pour 365 estomacs étudiés), suggérant que cette espèce se nourrit assez peu autour de ces DCP, même au crépuscule. Certaines migrations verticales nycthémerales sont en lien avec celles de certaines proies citées précédemment, puisque le zooplancton et notamment le micronecton (organismes compris entre 1 et 20 cm) remonte se nourrir en surface quand la nuit tombe (Hays, 2003; Benoit-Bird et al., 2009).

Dans l’ouest de l’océan Indien, les variations saisonnières de régime alimentaire doivent aussi être considérées : par exemple, chez *T. albacares* des différences dans les contenus stomacaux et ratios isotopiques ont permis de mettre en évidence un régime alimentaire plus gras, basé sur des petits poissons type *C. pauciradiatus* pendant la mousson de nord-est autour des Seychelles (Potier et al., 2008; Zudaire et al., 2015). Les changements alimentaires saisonniers des thons tropicaux sont sans conteste liés à l’écologie de leurs proies, dont la présence varie avec les zones et les saisons. Le crabe nageur *C. smithii* est par exemple plus commun

pendant la mousson de Sud-ouest et l'inter-mousson automnale (Romanov et al., 2009), tout comme la mante *N. investigatoris* (Losse and Merrett, 1971; Romanov et al., 2015).

D'un point de vue ontogénique, les études prenant en compte la taille observent une augmentation du niveau trophique avec la taille, liée à une augmentation de la taille moyenne des proies (e.g. Ménard et al., 2007a; Potier et al., 2007). Sur la base de contenus stomacaux et d'analyses isotopiques, Graham et al. (2006) estiment un changement de régime alimentaire chez *T. albacares* autour de 45-50cm, pour des individus côtiers capturés autour de DCP ancrés à Hawaï.

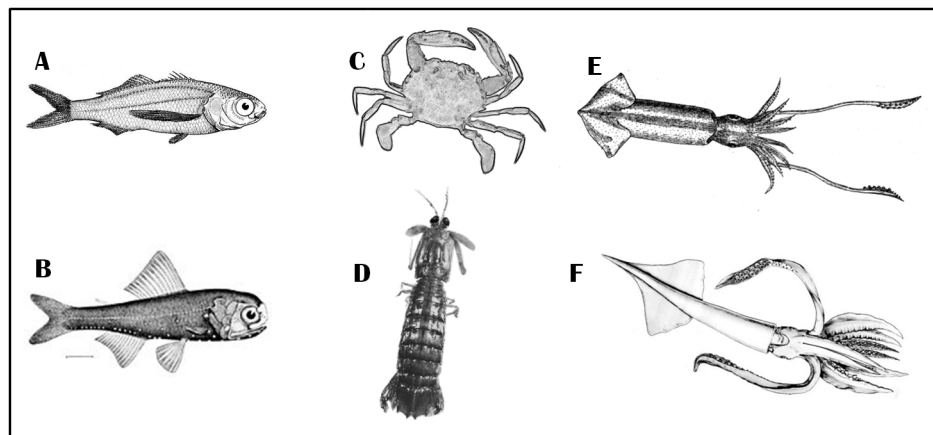


Fig. 1.6: Illustrations des principales espèces consommées par les thons tropicaux dans l'ouest de l'océan Indien.

A *Cupiceps pauciradiatus*, **B** *Diaphus metopoclampus*, **C** *Charybdis smithii*, **D** *Natosquilla investigatoris*, **E** *Sthenoteuthis oualaniensis*, **F** *Ornithoteuthis volatilis*. Images Wikimedia Commons modifiées, CC BY.

Chapitre 2

État de santé et allocation d'énergie chez les poissons

2.1 Définitions et considérations générales

2.1.1 La condition comme état de santé des poissons

En écologie, le terme "condition" réfère à l'état de santé général d'un animal, et est souvent associé à ses réserves énergétiques (Schulte-Hostedde et al., 2005). Cet état de santé doit renseigner sur la *fitness* d'un individu (i.e. valeur sélective, prenant en compte la survie et la fécondité d'un individu). A l'échelle d'une population, cet état de santé informe sur la capacité d'une population à se maintenir dans le temps, et tend à être de plus en plus considéré dans la gestion des stocks exploités, afin de s'assurer de leur pérennité (Lloret et al., 2013).

Le choix des indicateurs pour juger de cet état de santé est en revanche plus complexe, car tous les indicateurs ne convergent pas vers les mêmes conclusions. Historiquement, les indices de condition sont basés sur des caractéristiques externes (i.e. mesures morphométriques), le plus souvent sur des relations taille-poids. Parmi eux on retrouve les indices de Fulton (K ; Ricker, 1975), de condition relative de Le Cren (K_n ; 1951) ou de poids relatif de Murphy et al. (Wr ; 1990), qui considèrent que pour une taille donnée, un poisson plus lourd est en meilleure santé (Neumann et al., 2012). Communément utilisé, l'indice de Fulton considère une relation théoriquement cubique entre le poids et la taille (Bolger and Connolly, 1989), alors que l'indice de Le Cren considère la relation taille-poids empirique de la population étudiée, et implique donc d'établir cette relation sur la population d'intérêt. Les avantages et inconvénients de chacun de ces indices sont souvent discutés (Cone, 1989; Springer and Murphy, 1990), mais leur pertinence dépend aussi de la question posée (par exemple comparaison intra ou inter-population) et de l'espèce considérée (par exemple l'indice de Fulton pour les espèces à croissance isométrique).

D'autre part, le taux de gras (i.e. de lipides) d'un individu, est aussi utilisé pour juger de son statut énergétique puisque les lipides représentent la forme de stockage d'énergie majoritaire chez les poissons (Tocher, 2003; Parrish, 2013) : le contenu en lipides de stockage (i.e. réserve de graisse) reflèterait le surplus d'énergie pouvant être alloué aux grandes fonctions biologiques. En effet, chez certaines espèces le contenu en lipides est un bon indice de la probabilité de survie (Simpkins et al., 2003; Hurst and Conover, 2003) ou du potentiel de reproduction, y compris chez les thons tropicaux (Grande, 2013; Zudaire et al.,

2014). Des analyses de nutriments ou de l'activité enzymatique dans le sang peuvent aussi donner une idée de la condition d'un organisme (Couture et al., 1998; Dutil et al., 1998). Les ratios de certaines classes de lipides, notamment le ratio TriAcylGlycérides/Stérols (TAG/ST, respectivement des lipides de réserves et des lipides structuraux) ont aussi été utilisés comme indice de condition (Fraser, 1989; Kerambrun et al., 2012; Robert et al., 2014). Cependant, des mesures de taux de lipides, comme des autres analyses biochimiques, ne peuvent être conduites que sur un nombre restreint d'individus puisque elles impliquent généralement d'acheter et/ou abimer les poissons destinés à la vente (les techniques utilisant des prises de sang ne sont pas encore développées sur les thons) et sont surtout longues et coûteuses en termes d'analyse en laboratoire. Plus récemment, des méthodes rapides et non létales d'estimation du taux de lipides d'un individu ont été développées, telles que l'impédance bioélectrique et le Fatmeter (Distell®) (e.g. McPherson et al., 2010; Brosset et al., 2015; Willis and Hobday, 2008). Le premier considère la résistance des cellules à un courant électrique pour estimer un état physiologique; le second consiste en une électrode permettant d'estimer le contenu en eau d'un individu et de le convertir en contenu en lipides, sur la base d'une relation inverse établie entre ces deux contenus. Cependant, cette relation a été mise en évidence surtout sur des espèces tempérées dont la gamme de variation du taux de lipides est relativement large (e.g. Hartman and Margraf 2008; Goñi and Arrizabalaga 2010; Brosset et al. 2015), mais aucune relation claire entre le taux de lipides mesuré en laboratoire et celui fournit par le Fatmeter et n'a pu être vérifiée chez les thons tropicaux (Maitane Grande et Iker Zudaire, communications personnelles).

Ainsi, par extension, l'hypothèse selon laquelle les indices de condition reflètent le statut énergétique et donc lipidique d'un individu est souvent posée comme hypothèse de départ. En effet, cette relation entre indice de condition et densité énergétique des tissus a pu être établie pour certaines espèces (e.g. chez la morue *Gadus morhua* : Lambert and Dutil, 1997, le sandre *Sander vitreus* : Kaufman et al., 2007 ou le tacaud *Trisopterus luscus* : Alonso-Fernández and Saborido-Rey 2012). En revanche, aucune relation entre indice de condition et composition proximale des individus n'a été établie chez les thons tropicaux, malgré l'actuel besoin de suivre l'évolution de la condition de ces espèces soumises à de fortes pressions de pêches. D'autre part, les mécanismes de stockage et d'allocation d'énergie peuvent varier entre espèces et stades de développement des individus, complexifiant ainsi l'interprétation du statut énergétique recherché lors du suivi de la condition.

2.1.2 Allocation ou redistribution de l'énergie assimilée

Généralités sur l'allocation d'énergie chez les poissons

En 1970, Gadgil et Bossert introduisent le concept d'allocation d'énergie entre fonctions biologiques en ces termes "*Any organism has a limited amount of resources at its disposal, and these have to be partitioned between reproductive and nonreproductive activities. [...] Natural selection would tend to an adjustment of the reproductive effort at every age such that the overall fitness of the life history would be maximized*". Largement repris et développé depuis, le principe d'allocation d'énergie réfère donc, chez les hétérotrophes, à la redistribution de l'énergie acquise par l'alimentation, aux différentes fonctions biologiques. Ces fonctions sont souvent regroupées en trois grandes catégories : les fonctions de maintenance de l'organisme que constituent le comportement routinier et le métabolisme de base (i.e. comportement, maintien de l'homéostasie, immunité...), les fonctions liées à la croissance, et celles liées à la reproduction (Roff, 1983; Kooijman, 2010). Les fonctions de maintenance sont considérées comme obligatoires et donc prioritaires en cas de contraintes, entraînant de fait des compromis : l'énergie investie dans une fonction biologique n'est plus disponible pour

les autres (Post and Parkinson, 2001). Dans le cas des thons, le coût de la nage s'ajoute au métabolisme basal, puisqu'elle est obligatoire pour leur respiration (Korsmeyer and Dewar, 2001).

Chez les poissons, quatre grandes phases de vie aux besoins énergétiques différents ont été définies : la phase embryonnaire (pas d'ingestion, l'organisme vit sur ses réserves), les phases larvaire (environ 30 jours chez les thons) et juvénile (ingestion et allocation d'énergie au développement dont celui des tissus reproductifs), et enfin la phase adulte (ingestion et allocation d'énergie à la reproduction principalement). Pour un organisme, les compromis énergétiques entre les fonctions physiologiques varient donc au cours de l'ontogénie.

Outre les limites physiologiques propres à chaque espèce, les contraintes poussant à la hiérarchisation des fonctions métaboliques au niveau individuel ont deux origines principales : la quantité des ressources énergétiques disponibles ; et/ou l'étendue des dépenses énergétiques nécessaires à l'optimisation de la *fitness*. Chez les poissons en milieu naturel, le manque de ressources énergétiques peut être élevé aux premiers stades de développement (Le Pape and Bonhommeau, 2015), y compris chez les thons tropicaux (Margulies, 1993; Wexler et al., 2007), et bien qu'il soit relativement moins fréquent aux stades adultes, il peut contraindre les caractéristiques voire le maintien des populations (e.g. Cada et al., 1987; Dutil and Lambert, 2000). Quant à l'étendue des dépenses énergétiques, elle varie en permanence selon l'ontogénie et les conditions environnementales. Bien que des études expérimentales aient permis de montrer qu'à court terme, la plasticité physiologique de certains poissons leur permet d'ajuster leurs stratégies d'allocation d'énergie aux conditions rencontrées (e.g. Claireaux and Lagardère, 1999; Biro et al., 2005; Killen et al., 2011; Dupont-Prinet et al., 2010), de nombreuses pressions environnementales (i.e. stress) les influencent à plus long terme, telles que la densité des individus (Marchand and Boisclair, 1998; Jones, 1987), la présence de polluants (Cossa et al., 2012; Gilliers et al., 2012), ou un changement de température (Purchase and Brown, 2001).

Un exemple particulier de ces compromis énergétiques entre croissance et reproduction est l'existence d'"effet maternel" (Mousseau and Fox, 1998; Kamler, 2005), mis en évidence chez plusieurs espèces dont certains poissons (Chambers and Leggett, 1996; Berkeley et al., 2004a; Shelton et al., 2015). Il se caractérise principalement par le fait que de grandes femelles, dont la croissance n'est plus une priorité pour l'optimisation de la *fitness*, peuvent fournir plus de réserves énergétiques à leurs œufs, favorisant ainsi la croissance et donc la survie des embryons. Ainsi, chez les espèces à croissance indéterminée comme les poissons, la fécondité dépend de la taille, qui elle-même dépend des choix d'investissement reproductifs passés (Heino and Kaitala, 1999). On note également que chez les poissons, des gènes régulent la croissance indéterminée du muscle en vue du développement d'autres tissus (Johnston et al., 2011).

Enfin, le terme "énergie" regroupe en fait différents types de nutriments, à la structure et aux rôles variés. Une limitation énergétique peut donc exister tant d'un point de vue quantitatif que d'un point de vue qualitatif. En effet, certains nutriments ne sont pas synthétisés *de novo* par les animaux ou dans les niveaux trophiques supérieurs, mais sont pourtant indispensables au bon fonctionnement des organismes. Ces nutriments dits "essentiels" regroupent notamment certains acides gras (i.e. oméga-3 et 6), acides aminés (i.e. phénylalanine, lysine ou leucine...) ou vitamines et oligo-éléments, dont les besoins peuvent changer au cours de l'ontogénie (Sargent et al., 1999; Morais et al., 2011).

Études bio-énergétiques chez les thons tropicaux

Chez toutes les espèces, les mécanismes d'allocation d'énergie demeurent des processus complexes et difficiles à suivre. Plusieurs approches travaillant à différentes échelles d'intégration peuvent être nécessaires pour obtenir une vue d'ensemble de ces mécanismes.

Historiquement, l'allocation d'énergie à la reproduction est suivie sur la base de l'indice gonado-somatique (GSI). Souvent couplé à l'indice hépato-somatique (HSI), cet indice considère que le changement de poids d'un organe (gonades, foie) représente un changement du statut énergétique, de la même manière que les indices de condition évoqués précédemment. L'avantage de ces indices tient au fait qu'ils sont relativement simples à mesurer à l'échelle de la population, mais ils impliquent le sacrifice d'individus et sont peu précis pour quantifier et qualifier l'investissement énergétique individuel. Couplés à des analyses histologiques, ces indices organo-somatiques ont toutefois permis la mise en évidence de périodes et types de reproduction différentes entre *K. pelamis* et *T. albacares* (Grande et al., 2010; Zudaire et al., 2013b). Concernant la croissance, Dortel et al. (2015) et Eveson et al. (2015) ont couplé différentes méthodes (analyse de progression modale et lecture d'otolithes) pour estimer les taux de croissance des trois populations de thons tropicaux dans l'Ouest de l'océan Indien. L'ensemble de ces données sur les populations contribuent à la détermination de traits de vie "phénotypiques" (Tableau 2.1).

Bien qu'apportant une information ponctuelle, les analyses des contenus énergétiques des tissus sont possibles sur des populations naturelles. Les mesures de combustion dans des bombes calorimétriques permettent d'obtenir la quantité d'énergie totale contenue dans un organisme ou un tissu. Cependant, elles ne permettent pas de savoir sous quelle forme se présente l'énergie. Ainsi, les analyses de composition biochimique des tissus sont également courantes, et reposent sur une mesure des taux de lipides, protéines, glycogène (composé minoritaire chez les poissons), eau et cendres, et/ou de la détermination des acides gras (composants des lipides) et acides aminés (composants des protéines). Chez les poissons, les lipides sont souvent étudiés avec un intérêt particulier, de part leur rôle de stockage d'énergie (Parrish, 2013). Dans le cas des thons tropicaux, le suivi des différentes classes de lipides dans plusieurs tissus a contribué à préciser des stratégies de reproduction déjà évoquées précédemment (Grande, 2013; Zudaire et al., 2014). Mais chez les thons, les études de composition proximale des tissus sont souvent à visée nutritionnelle pour l'homme ou industrielle (Tableau 2.1), exception faite des études sur les acides gras et acides aminés, qui sont également utilisés dans la reconstruction des réseaux trophiques (e.g. Saito et al. 1996; Popp et al. 2007; Parrish et al. 2013; Lorrain et al. 2015).

A l'échelle individuelle, des études expérimentales ont permis d'estimer des taux métaboliques chez les thons, souvent par respirométrie (mesure de la consommation d'oxygène et des produits d'oxydation). Couplées à des études d'échelle cellulaire et sub-cellulaire, ces expériences en conditions contrôlées permettent de suivre les différents temps de réponse et adaptations des individus (Tableau 2.2). D'un point de vue plus bio-énergétique, des mesures de taux de d'absorption d'énergie peuvent aussi être faites en bassin, avec une alimentation dont la composition biochimique est connue. Ainsi, Olson and Boggs (1986) ont utilisé le taux d'élimination du césium pour rendre compte de l'énergie assimilée chez *T. albacares*. Bien que moins évidente à cause de la difficulté à maintenir des thons adultes en bassin, les expériences en captivité sont de plus en plus envisageables grâce à un certain intérêt pour l'aquaculture de thons (Wexler et al., 2003). Pour le moment, les études menées sur les thons tropicaux concernent majoritairement les premiers stades (œufs et larves) de *T. albacares* (Wexler et al., 2007, 2011; Partridge et al., 2011), mais très récemment Klinger et al. (2016) ont estimé la dépense énergétique post-prandiale de *T. albacares* d'environ 7.9 kg à 5.9 % de l'énergie ingérée à 20 °C et 12.7 % à 24 °C. Ces études sont globalement plus développées sur les espèces de thons rouges. Par exemple, chez *T. orientalis* compris entre 2.5 et 181 kg, Estess et al. (2014) ont pu mettre en évidence un gain journalier moyen de 250 kJ soit 12 % de l'énergie absorbée, et des taux de conversion de l'alimentation différents selon la qualité des régimes alimentaires. Ces faibles valeurs semblent indiquer une absorption relativement peu efficace, pourtant la dépense énergétique post-prandiale chez cette espèce

semble indiquer le contraire (9.2% de l'énergie ingérée pour des individus entre 9.7 et 11 kg à 20 °C ; Clark et al., 2010) : de nouvelles études devraient être menées pour clarifier ce point. Les études d'expression de gènes en lien avec le métabolisme énergétique concernent aussi principalement les thons rouges, comme c'est le cas pour les élongases et désaturases intervenant dans le métabolisme lipidique (Morais et al., 2011 chez *T. thynnus* et Scholefield et al., 2015 chez *T. maccoyii*), pour la vitellogénine et ses récepteurs intervenant dans la reproduction (Pousis et al., 2011; Gardner et al., 2012; Pousis et al., 2012 chez *T. thynnus*) ou encore d'enzymes stimulant l'appétit (Suda et al., 2012 chez *T. orientalis*). Concernant le métabolisme lipidique, on note cependant que les résultats obtenus sur la base des expressions de gènes (e.g. Scholefield et al., 2015) et ceux obtenus sur la base des concentrations en lipides particuliers (e.g. Scholefield and Schuller, 2014) sont parfois contradictoires, appuyant le besoin d'études spécifiques pour améliorer notre compréhension du métabolisme lipidique chez les thons.

Enfin, de manière transversale, des modèles bio-énergétiques sont également développés sur la base des informations apportées par l'ensemble des approches précédemment évoquées. En océanographie biologique, l'utilisation de ces modèles a fortement augmenté, notamment avec la théorie *Dynamic Energy Budget* (DEB) proposée par Kooijman (2010). A l'heure actuelle, plusieurs modèles bio-énergétiques existent pour le thon rouge (e.g. Chapman et al. 2011 sur *T. thynnus* et Jusup et al. (2011) sur *T. orientalis*), mais aucun sur *T. obesus* et globalement peu sur les thons tropicaux. Essington et al. (2001) et Essington (2003) ont cependant proposé des modèles statiques (de type Scope for growth) pour *K. pelamis* et *T. albacares*. Ces derniers mettent en avant le fait que la proportion d'énergie allouée au métabolisme standard et à la reproduction était plus forte chez *K. pelamis*. Mais l'ajustement de tels modèles demande la connaissance de nombreux paramètres métaboliques qui, s'ils ne sont pas connus dans la littérature, sont alors fixés par commodité.

Ainsi, comprendre les mécanismes d'allocation d'énergie chez les thons tropicaux reste un défi et les approches pour le relever ne sont pas standardisées. Le choix de ces différentes méthodes tient surtout aux questions posées (e.g. étude à l'échelle de la population en milieu naturel ou étude physiologique) et à la disponibilité des échantillons. En effet, le maintien de thon en bassin nécessite des infrastructures adaptées et coûteuses, mais pour travailler sur les populations le coût d'achat d'un nombre suffisant d'individus issus de la pêche peut s'avérer limitant.

Table 2.1: Liste non-exhaustive d'études portant des informations sur les stratégies d'allocations d'énergie chez les thons tropicaux par différentes approches : Caractéristiques de l'espèce ; Traits de vie des populations et Composition proximale. Pour chaque approche, les références sont données par ordre chronologique. Certaines études proposent des comparaisons avec d'autres espèces non mentionnées ici. BET = *T. obesus*; SKJ = *K. pelamius*; YFT = *T. albacares*; GSI = Indice Gonado-Somatique.

Principales fonctions biologiques étudiées	Contexte et détails de l'étude	Espèce étudiée	Références
nage	comparaison des types de nage entre espèces	BET, SKJ, YFT	Magnuson 1973
métabolisme basal	détermination de la structure de la myoglogie	YFT	Watts et al 1980
nage	comparaison des proportions de muscles rouge et blanc entre espèces	BET, SKJ, YFT	Graham et al 1983
nage	comparaison de morphologies, dont le volume de la vessie natatoire	BET, YFT	Schaefer 1999
nage	comparaison des volumes de vessie natatoire	BET, YFT	Bertrand et Josse 2000
nage	structure et fonction des tendons caudaux	YFT	Shadwick et al 2002
métabolisme basal	comparaison de la forme du bulbe artériel entre espèces	BET, YFT	Braun et al 2003
métabolisme basal	détermination de la structure de la myoglogie	BET, SKJ, YFT	Ueld et Ochial 2004
métabolisme basal + nage	comparaison des surfaces branchiales entre espèce	SKJ, YFT	Wegner et al 2009
croissance	lecture d'épines dorsales	SKJ	Batts 1972
reproduction	GSI et niveau de maturité	SKJ	Cayré et Lalbé 1986
croissance larvaire	lecture d'otolithhe	YFT	Lang et al 1994
croissance	lecture d'otolithhe	YFT	Lehodey et Leroy 1999
croissance	lecture d'otolithhe	BET	Sun et al 2001
croissance	lecture de vertèbres	BET	Alves et al 2002
croissance	lecture d'épines dorsales	YFT	Lessa et Duarte 2004
croissance	lecture d'otolithhe	BET	Stéguet et Conard 2004
croissance	lecture d'otolithhe	BET	Farley et al 2006
croissance	données de marquage	SKJ	Haller et Gaertner 2006
croissance	lecture d'otolithhe et données de marquage	BET	Schaefer et Fuller 2006
reproduction	GSI, taille à maturité	BET	Zhu et al 2010
reproduction	GSI, taille à maturité et fécondité des femelles	SKJ	Grande et al 2013
reproduction	GSI, taille à maturité et fécondité des femelles	BET	Sun et al 2013
reproduction	GSI, taille à maturité et fécondité des femelles	YFT	Zudaire et al 2013
croissance	lecture d'otolithhe et données de marquage	YFT	Dortel et al 2015
croissance	lecture d'otolithhe et données de marquage	BET, YFT, SKJ	Eveson et al 2015
nutrition humaine	composition proximale multi-tissus	SKJ	Vlieg et al 1983
nutrition humaine	composition proximale des muscles	SKJ	Balogun et Talabi 1985
métabolisme basal	capacités de récupération des muscles rouge et blanc après effort	BET, SKJ, YFT	Suzuki et al 1987
nutrition humaine	composition en acides gras structuraux du muscle blanc	BET, SKJ, YFT	Medina et al 1995
valorisation industrielle	composition en lipides et acide gras des gonades	SKJ	Hiratsuka et al 2004
nutrition humaine	composition proximale du muscle blanc	SKJ, YFT	Khodabux et al 2006
valorisation industrielle	composition en protéines et lipides des viscères	YFT	Ovisipour et al 2010
nutrition humaine	composition proximale, en acides gras et aminés des gonades	SKJ	Intarasrisawat et al 2011
reproduction	composition du muscle blanc, dont acides gras et aminés	BET, YFT	Peng et al 2013
reproduction	répartition des lipides entre gonades, foie et muscle blanc	SKJ	Grande et al 2014
reproduction	répartition des lipides entre gonades, foie et muscle blanc	YFT	Zudaire et al 2014

Table 2.2: Liste non-exhaustive d'études portant des informations sur les stratégies d'allocations d'énergie chez les thons tropicaux par l'étude du métabolisme cellulaire ou individuel en conditions expérimentales. Les références sont données par ordre chronologique. Certaines études proposent des comparaisons avec d'autres espèces non mentionnées ici. BET=*T. obesus*; SKJ=*K. pelamis*; YFT=*T. albacares*.

Principales fonctions biologiques étudiées	Contexte et détails de l'étude	Espèce étudiée	Références
thermorégulation	mesure de température en plusieurs points du corps	BET, YFT	Carey et Teal 1966
métabolisme basal	des muscles selon les niveaux d'oxygène et température	BET, SKJ	Gordon 1968
thermorégulation	selon la température de l'eau	SKJ	Stevens et Fry 1971
métabolisme basal	consommation d'oxygène	SKJ	Stevens 1972
thermorégulation	selon la température et l'acclimation	SKJ, YFT	Dizon et al 1977
nage	vitesse de nage selon oxygène et salinité	SKJ, YFT	Dizon 1977
métabolisme basal	selon le taux d'oxygène et taille des poissons	SKJ	Gooding et al 1981
métabolisme basal	turn-over du glucose et des lactates (cycle de Cori)	SKJ	Weber et al 1986
métabolisme cardiaque	adaptation à l'hypoxie	BET,SKJ,YFT	Bushnell et al 1990
métabolisme basal	viscosité du sang et hématocrite selon la température	YFT	Brill et Jones 1994
métabolisme basal	besoins énergétiques: évacuation gastrique des proies (césium) durant le jeûne	YFT	Olson et Boggs 1986
métabolisme basal	adaptation du système cardio-vasculaire à l'hypoxie	SKJ, YFT	Boogs et Kitchell 1991
métabolisme cardiaque	selon les taux d'oxygène et la température	SKJ, YFT	Bushnell et Brill 1992
nage	selon la vitesse de nage	SKJ, YFT	Dewar et Graham 1994
métabolisme basal	selon la vitesse de nage	YFT	Dewar et al 1994
thermorégulation	selon la vitesse de nage	YFT	Dewar et al 1994
nage	performances cardiaques selon la vitesse de nage et la température	YFT	Korsmeyer et al 1997
nage	transport d'oxygène selon la vitesse de nage	YFT	Korsmeyer et al 1997
croissance larvaire	croissance et développement du système digestif	YFT	Kaji et al 1999
nage	Électro-myogrammes (activité musculaire) durant la nage	SKJ, YFT	Knower et al 1999
osmorégulation	activité de l'ATPase Na ⁺ /K ⁺ dans l'intestin et les branchies	SKJ, YFT	Brill et al 2001
métabolisme cardiaque	performances selon la température, le Ca ²⁺ et l'épinéphrine	SKJ, YFT	Blank et al 2002
reproduction	comparaison génétique des fréquences de ponte	YFT	Niwa et al 2003
métabolisme cardiaque	activités enzymatiques selon la température et l'oxygène	BET,SKJ,YFT	Swimmer et al 2005
métabolisme basal	selon la vitesse de nage	YFT	Blank et al 2007
thermorégulation	suivi <i>in situ</i> par des marques archives, lien avec nage	BET	Malte et al 2007
reproduction	investissement selon la température et la ration alimentaire	YFT	Margulies et al 2007
croissance larvaire	développement de la vessie natatoire selon la photopériode	YFT	Partridge et al 2011
croissance larvaire	capacités digestives et activités enzymatiques selon le développement	YFT	Buentello et al 2011
survie larvaire	selon le taux d'oxygène et la température	YFT	Wexler et al 2011
survie larvaire	selon l'acidité de l'eau	YFT	Bromhead et al 2014
reproduction	gonadogénèse et développement des cellules germinales	YFT	Kobayashi et al 2015
métabolisme basal	dépense énergétique post-prandiale selon la température	YFT	Klinger et al 2016

Objectifs de la thèse

Les objectifs principaux de ce travail sont de comprendre, chez les trois espèces de thons tropicaux, les mécanismes biologiques et écologiques influençant l'état de santé des individus, considérant que l'énergie dont un individu dispose pour assurer sa survie et sa reproduction renseigne sur son état de santé. Une approche principalement focalisée sur les composés énergétiques a donc été adoptée, et développée au travers de trois questions :

(i) d'où vient l'énergie chez ces espèces ?

Au travers de cette question, l'objectif est déterminer si l'énergie à la même origine chez les trois espèces de thons tropicaux, et donc si ces espèces sont en compétition pour l'accès aux ressources énergétiques, et dans un second temps de tester si les sources d'énergie changent au cours de l'ontogénie pour chaque espèce.

(ii) une fois assimilée, comment se répartie l'énergie dans l'organisme ?

L'objectif est de préciser sous quelle forme les composés énergétiques, acquis par l'alimentation, sont répartis dans les principaux tissus et organes impliqués dans les grandes fonctions physiologiques de l'organisme, afin de préciser la stratégie d'utilisation de l'énergie chez ces espèces.

(iii) d'un point de vue pratique, peut-on suivre simplement la quantité d'énergie dont un individu dispose ?

Afin d'améliorer le suivi à plus grande échelle de l'état de santé des individus, l'objectif est de tester si une méthode rapide d'estimation de l'état de santé pourrait être mis en place.

En parallèle, il apparaît nécessaire de considérer les influences environnementales, liées notamment au régime des moussons et à la présence du canal du Mozambique, mais aussi les influences des différents traits de vie des trois espèces, notamment en terme de rythme de croissance et de stratégie de reproduction.

De manière à répondre à ces questions, l'utilisation de marqueurs isotopiques et lipidiques s'imposait pour déterminer d'éventuelles différences alimentaires inter-spécifiques sur le long terme, car ces espèces de thons sont largement sympatriques et s'agrègent souvent pour se nourrir. Ce choix se justifie d'autant plus que les lipides sont une forme d'énergie particulière, largement étudiés sur le plan nutritionnel car leur rendement énergétique est élevé (Kleiber, 1961) et parce que d'un point de vue structurel certains lipides sont essentiels à la santé des organismes (Tocher, 2003; Kainz et al., 2004). Ainsi, la composition proximale des tissus et organes ayant différentes fonctions physiologiques a été étudiée pour suivre la répartition d'énergie. Enfin, les composés lipidiques et notamment ceux impliqués dans l'homéostasie, ont donc été suivis pour leurs rôles physiologiques prépondérants.

Partie II

Une approche multi-tissus et multi-traceurs: présentation des outils et de leurs méthodes d'analyses

Chapitre 3

Une approche multi-tissus et multi-traceurs

Ce chapitre a pour but de détailler la démarche choisie chez trois espèces de thons tropicaux pour étudier l'allocation d'énergie aux grandes fonctions biologiques d'un point de vue qualitatif et quantitatif, et pour étudier les différences alimentaires entre espèces. Quatre tissus représentant des fonctions biologiques différentes ont été analysés sur les trois espèces de thon avec différents traceurs énergétiques et trophiques : la composition proximale, comprenant les taux de lipides et protéines ; les marqueurs lipidiques (classes de lipides et acides gras) et les compositions isotopiques en carbone et azote. La présentation des tissus puis les traceurs sélectionnés constituent les deux sections suivantes.

3.1 Tissus représentant des grandes fonctions biologiques

Les quatre tissus étudiés ont été sélectionnés pour leurs différentes fonctions biologiques et *turnovers* (i.e. taux de renouvellement des constituants cellulaires : plus le *turnover* d'un tissu est rapide plus sa composition reflètera des événements récents). De plus, il est important de souligner l'absence de tissu mésentérique servant de dépôt de graisse chez les thons tropicaux.

Muscle blanc : Il représente 80-90% de la masse musculaire chez les thons. Son *turnover* isotopique est relativement lent (de l'ordre de quelques mois, Madigan et al. 2012) et est donc le plus couramment utilisé dans les études trophiques (Pinnegar and Polunin, 1999). Son métabolisme principal est glucidique et possiblement anaérobie, et il intervient lors des phases d'accélération (cf. section 1.2.1). Dans le muscle blanc de *T. orientalis*, des différences de taux de lipides entre parties du corps sont connues : le muscle blanc ventral est généralement plus gras qu'en position dorsale (Nakamura et al., 2007; Estess et al., 2014). Chez les poissons en phase de croissance, le muscle blanc représente la majorité de la synthèse protéique, notamment pour la synthèse de myofibrille (Mommsen, 2001).

Muscle rouge : Il est constitué de fibres musculaires de faible diamètre ($\approx 35 \mu\text{m}$) en comparaison à celles du muscle blanc ($\approx 66 \mu\text{m}$), il est riche en myoglobine, mitochondries et gouttelettes lipidiques (George and Stevens, 1978). La myoglobine du muscle rouge lui confère sa couleur et alimente en O_2 les mitochondries. En effet, son métabolisme est principalement lipidique et exclusivement

aérobie, bien que ce tissu contienne également du glycogène. Ce muscle intervient notamment dans la nage de routine (cf. section 1.2.1). Sa proportion diffère selon les espèces et pour une espèce donnée, elle varie le long du corps et tend à diminuer avec la taille des individus (Graham et al., 1983).

Foie : Il est étudié pour son rôle dans la synthèse d'un grand nombre de composés à destination des tissus somatiques et germinaux (e.g. lipoprotéines, hormones...) et ses potentielles capacités de stockage d'énergie. Son *turnover* plus rapide que les muscles (de l'ordre de quelques semaines) reflète donc le métabolisme à plus court terme. A l'inverse du muscle blanc, chez les femelles de *T. albacares*, son taux de lipides est en lien avec le stade de maturité des gonades (Zudaire et al., 2014). On peut noter également le rôle d'épuration de l'organisme assuré par cet organe "multi-fonctionnel" (Brusle and Anadon, 1996).

Gonades : Elles représentent l'investissement reproductif d'un individu, et leur taille varie donc avec les saisons de reproduction et la maturité, et augmente avec la taille des individus. Chez les femelles de *T. albacares* et *K. pelamis*, les ovaires sont généralement riches en lipides de réserve avant la ponte (Zudaire et al., 2014; Grande, 2013), mais peu d'information est disponible chez les mâles, en dehors des indices gonado-somatiques. Ainsi, chez *T. albacares* et *T. obesus* l'indice gonado-somatique est inférieur chez les mâles alors qu'il est relativement similaire entre les deux sexes chez *K. pelamis* (Stéquert et al., 2001; Nootmorn, 2004). Stéquert et al. (2001) observent aussi une corrélation entre l'indice gonado-somatique et le niveau d'hormones stéroïdiennes chez *T. albacares* et *K. pelamis* dans les deux sexes. Chez les thons, seule l'examen des gonades ayant atteint un certain niveau de développement permet de distinguer les poissons mâles et femelles.

3.2 Traceurs énergétiques et trophiques

3.2.1 Composition proximale et classes de lipides

La composition proximale correspond à la composition biochimique "globale" d'un tissu. Les proportions de composés énergétiques (lipides, protéines, et glycogène) sont généralement estimées, accompagnées des contenus en eau et cendres. Chez les poissons, les lipides constituent la forme de stockage énergétique principale (Parrish, 2013; Tocher, 2003) alors que le glycogène est un composé très minoritaire (e.g. Vlieg et al., 1983; Alonso-Fernández and Saborido-Rey, 2012) qui est souvent entièrement consommé lors d'un stress tel que la pêche (Black and Love, 1988) et donc plus rarement mesuré. Ici nous avons donc considéré les proportions de lipides selon leur rôle physiologique (de stockage ou structural) et les taux de protéines totaux.

Ainsi, les lipides peuvent être séparés en "classes de lipides" sur une base fonctionnelle et chimique. La séparation des lipides en classes, généralement selon leur polarité, permet de préciser leur rôle fonctionnel dans les tissus: les lipides neutres servent de réserve alors que les lipides polaires ont un rôle structural, constituant notamment les membranes cellulaires. Cependant ces deux types sont constitués des même sous-unités, les acides gras (AG), qui seront présentés dans la section suivante. Ainsi, parmi les lipides neutres, les TriAcylGlycérols (TAG) et les stérols-estérifiés (SE) sont hydrophobes et constituent une réserve d'AG mobilisables pour produire de l'énergie via la β -oxydation, ou pour synthétiser de nouveaux lipides structuraux (Athenstaedt and Daum, 2006). Les TAG sont constitués d'un glycérol sur lequel sont rattachés

trois AG (Fig. 3.1A). Les SE sont formés d'un stérol estérifié à un AG et constituent une forme de stockage d'énergie à plus long terme. Ils permettent aussi de réguler la flottaison des œufs chez les poissons (Johnson, 2009). Parmi les lipides polaires (i.e. structuraux), les phospholipides (PL) ont une "tête" hydrophile et deux "queues" hydrophobes (i.e. deux AG ; Fig. 3.1B), permettant notamment la formation de la bicouche lipidique constituant les membranes cellulaires (Fig. 3.2E). La nature de la tête polaire permet de différencier principalement quatre grands types de PL: les phosphatidyl-choline, -ethanolamine, -inositol et -sérine, auxquels viennent s'ajouter des sphingomyélines. Enfin, les stérols (ST) servent dans le fonctionnement membranaire et en tant que précurseurs de nombreuses hormones.

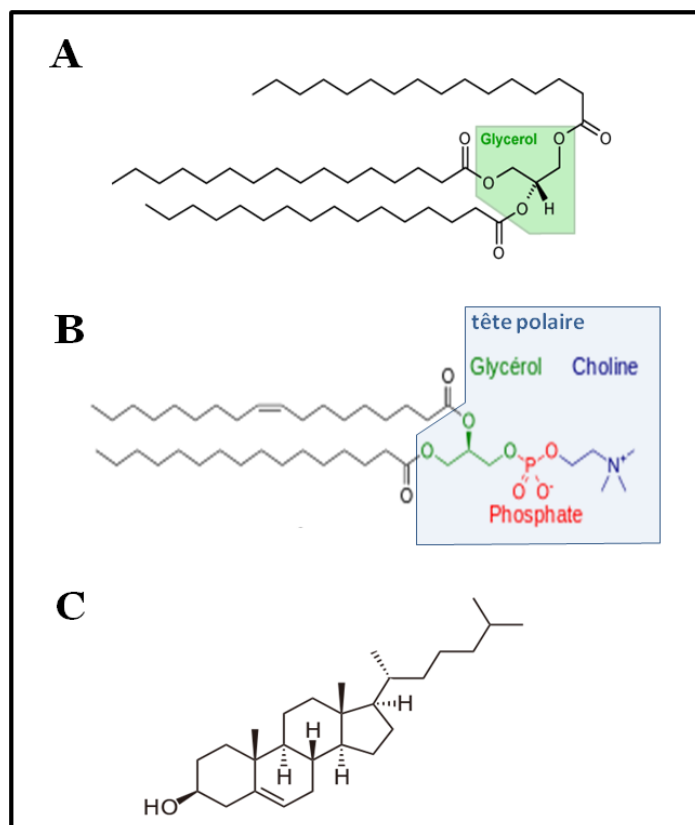


Fig. 3.1: Formule topologique de (A) un triacylglycérol constitué d'un glycérol et de trois acides gras, en l'occurrence d'acides palmitiques (16:0); de (B) un type de phospholipide, en l'occurrence une phosphatidylcholine ou lécithine constituée d'une tête polaire (choline, phosphate, glycérol) et de deux acides gras: un acide oléique (18:1 ω 9) et un acide palmitique; (C) un stérol, en l'occurrence le cholestérol. Images Wikimedia Commons modifiées, CC BY-SA 3.0.

Les protéines ont des rôles essentiellement structuraux (e.g. dans le cas des fibres musculaires telles que la myosine et l'actine) et fonctionnels importants (e.g. enzymes). La synthèse de protéines et le renouvellement des protéines existantes constituent des mécanismes coûteux en énergie (Houlihan, 1991). Chez les carnivores comme les thons, les protéines sont aussi une source d'énergie importante: les acides aminés issus de la digestion des protéines sont principalement dégradés pour récupérer de l'énergie ou, en moindre mesure, transformés en nouvelles protéines dans l'organisme. Enfin, on observe également des complexes entre protéines et lipides, i.e. les lipo-protéines (Fig. 3.2D), qui permettent notamment le transport de lipides hydrophobes dans la circulation générale depuis le foie vers leurs tissus ou organes de destination.

3.2.2 Les acides gras (AG)

Les AG sont des unités de base qui constituent la majorité des lipides chez tous les organismes (à l'exception des *Archae*). Rarement à l'état libre, ils se présentent plutôt sous la forme de lipides de stockage, constituant alors un pool d'énergie utilisable en cas de besoin, ou sous la forme de lipides de structure pour constituer

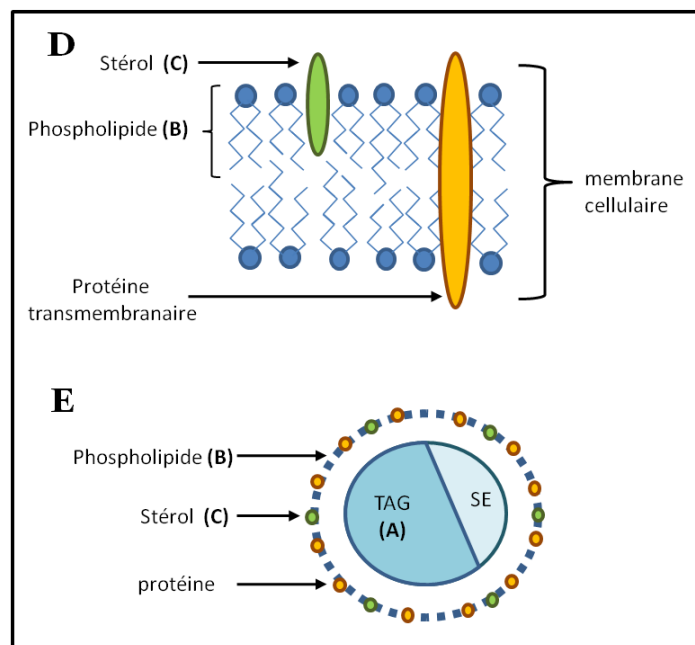


Fig. 3.2: Schémas représentant l'organisation de (E) la bi-couche lipidique constituant les membranes cellulaires et (D) une lipoprotéine, permettant le transport de lipides dans la circulation générale. La structure des composés (A) triacylglycérol, (B) phospholipide et (C) stérol, est présentée dans la figure 3.1. Inspiré de Arts et Kohler (2009).

notamment les membranes cellulaires (voir section 3.2.1).

D'un point de vue chimique, les AG sont des chaînes carbonées, contenant le plus souvent entre 14 et 24 carbones, débutant par un groupement méthyle ($-\text{CH}_3$) et se terminant par un groupement carboxyle ($-\text{COOH}$). Ils sont classés en grandes familles, correspondant généralement à leur degré d'insaturation (i.e. nombre de double liaison) et à la position de la dernière insaturation : les AG saturés (AGS) ne comportent aucune double liaison, les mono-insaturés (AGMI) en comptent une, et les poly-insaturés (AGPI) entre 2 et 6. Lorsque qu'un AG possède plusieurs doubles liaisons, celles-ci sont successives sur la chaîne carbonée et seule la position de la dernière est spécifiée pour identifier l'AG. Selon les nomenclatures, cette position de la dernière double liaison est précisée après le " ω " ou le "n-". Par exemple, l'acide docosahexaénoïque (DHA) est un AG à 22 carbones et 6 doubles liaisons dont la dernière est située sur le carbone numéro 3, et sera donc noté $22:6\omega3$ ou $22:6n-3$. On note aussi l'existence d'AG ramifiés et, uniquement chez les invertébrés marins, d'AG *Non-methylene Interrupted* (NMI) dont les doubles liaisons ne sont pas successives. Ainsi, plus de 70 AG différents sont connus et identifiables selon les méthodes utilisées (Iverson, 2009).

Aspect nutritionnel et physiologique des acides gras

Les AG sont synthétisés à partir de la transformation de l'Acétyl-coenzyme A en acide palmitique ($16:0$), qui est le précurseur des autres AG. Des étapes d'élongation (dans les mitochondries) et de désaturation (dans le réticulum endoplasmique) sont assurées par des élongases et des désaturases, qui permettent d'obtenir les nombreux AG nécessaires au métabolisme (Fig. 3.3). Les animaux sont capables de synthétiser *de novo* les AG saturés et ceux des familles $\omega7$ et $\omega9$, mais incapables de produire l'acide linoléique ($18:3\omega3$) et l'acide linoléique ($18:2\omega6$) à partir de l'acide oléique ($18:1\omega9$), car ils n'ont pas les $\Delta15$ -désaturase et $\Delta12$ -désaturase, présentes chez les autotrophes (flèches rouges sur la Fig. 3.3). Chez les poissons marins, l'activité de la $\Delta5$ -désaturase est faible, limitant aussi la synthèse d'AG poly-insaturés (AGPI) tels que le $22:6\omega3$ (acide docosahexaénoïque ; DHA), le $20:5\omega3$ (acide eicosapentaénoïque ; EPA), et le $20:4\omega6$ (acide arachinoïque ; ARA). Ces AG sont pourtant indispensables aux mécanismes physiologiques et biochimiques essentiels au

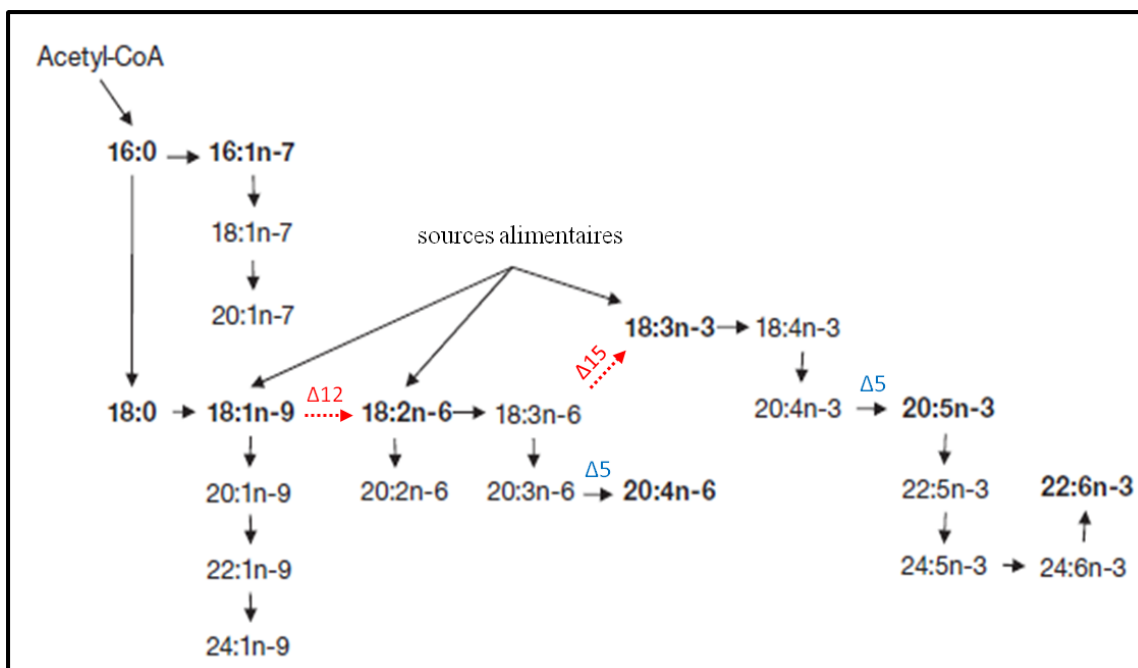


Fig. 3.3: Voies de biosynthèses majeures des acides gras chez les animaux. Les flèches horizontales correspondent à une étape de désaturation (ajout d'une double liaison), celles verticales descendantes à une étape d'élongation (ajout de 2 carbones) et celle ascendantes à une étape de β -oxydation peroxisomale (suppression de 2 carbones). Les Δ indiquent les désaturases non (en rouge) ou peu (en bleu) actives chez les poissons marins. Modifié de Kelly et al. (2012).

développement (Arts et al., 2001), et devront être trouvés dans l'alimentation : ils sont donc dits "essentiels" aux poissons marins. Selon les espèces considérées, les exigences en AG essentiels varient qualitativement et quantitativement (Izquierdo, 1996; Sargent et al., 1999).

Lorsqu'ils constituent les phospholipides, l'EPA et le DHA modulent les propriétés des membranes cellulaires en termes de fluidité, notamment en réponse à des changements de température grâce à leur haut degré d'insaturation (point de fusion autour de -50°C). Cette régulation de la fluidité membranaire permet aux cellules de maintenir, entre autres, leur perméabilité, leur élasticité ou leurs activités enzymatiques dans une large gamme de conditions environnementales (Lee, 2003; Wassall et al., 2004). L'activité des protéines transmembranaires (Fig. 3.2E) est aussi dépendante de la présence de DHA à leur proximité (Arts and Kohler, 2009; Wassall and Stillwell, 2009). D'autre part, l'EPA et l'ARA constituent les précurseurs des eicosanoïdes qui sont des médiateurs intervenant notamment dans les réponses inflammatoires et immunitaires et sur le métabolisme énergétique (Bell and Sargent, 2003; Arts and Kohler, 2009). Les eicosanoïdes dérivés de l'EPA ou de l'ARA sont des régulateurs antagonistes (Schmitz and Ecker, 2008), dont les proportions dépendent du rapport de leurs AG précurseurs dans les membranes cellulaires et l'alimentation (Bell et al., 1996; Tocher et al., 2008). En effet, les lipides structuraux présentent une certaine homéostasie face aux variations des apports en AG alimentaires, mais dans une certaine limite car l'affinité des enzymes pour des AG particuliers n'est pas exclusive (Sargent et al., 1993). Chez les poissons, même si l'alimentation est riche en lipides, des rapports adéquats entre AGPI essentiels sont indispensables au bon développement de l'organisme (Bell et al., 1998; Sargent et al., 1999). Globalement, on observe un facteur d'accumulation de ces AGPI plus fort dans les lipides polaires que dans les lipides neutres (Regost et al., 2003; Koussoroplis et al., 2011). Par

ailleurs, les tissus de thon présentent un rapport DHA:EPA particulièrement fort comparé aux autres espèces de poissons (i.e. 4.7–7.9 dans les phospholipides des larves de *T. thynnus*; Morais et al., 2011), suggérant un catabolisme sélectif de l'EPA par rapport au DHA (Ishihara and Saito, 1996; Mourente and Tocher, 2009)

Aspect trophique de l'utilisation des acides gras

Quand l'apport alimentaire en lipides est suffisant, les voies de transformation des AG sont ralenties et la majorité des AG provient alors de l'alimentation sans avoir subi trop de modifications. Dans ce cas, la continuité métabolique de certains AG lors du transfert proie-prédateur permet de les utiliser en tant que traceurs des relations trophiques. En effet, à l'inverse des protéines qui vont être totalement déstructurées lors de la digestion, chez des animaux mono-gastriques (i.e. estomac à une seule chambre), le suivi des AG dans le réseau trophique est possible car les AG provenant de l'alimentation sont peu modifiés (Budge et al., 2006). Aussi, comme la composition en AG des lipides neutres est moins soumise au forçage métabolique, elle reflète plus fidèlement la composition en AG des proies que celle des lipides polaires (Benedito-Palos et al., 2010; Koussoroplis et al., 2010), qui sont suspectés d'avoir un *turnover* plus lent (Veefkind, 1997).

L'utilisation trophique des AG nécessite de pouvoir identifier les sources, si possible uniques, d'AG retrouvés dans le consommateur. Certaines grandes tendances ont pu être observées : parmi les micro-algues, les diatomées produisent proportionnellement plus d'EPA et les dinoflagellées plus de DHA (Volkman et al., 1998; Dalsgaard et al., 2003). Chez des bactéries hétérotrophes, on retrouve majoritairement des AG saturés tels que 15:0 et 17:0 (Dalsgaard et al., 2003). Chez les consommateurs, et notamment chez les copépodes, certains ratios d'AG (e.g. DHA/EPA, 18:1 ω 9/18:1 ω 7) ont pu être associés au degré de carnivorie (El-Sabaawi et al., 2008). Cependant, un AG seul est rarement spécifique d'un groupe homogène d'organismes (Dalsgaard et al., 2003), dont la composition en AG peut varier dans le temps et l'espace (Dethier et al., 2013; Guest et al., 2010). D'autre part, comme pour tout marqueur biologique, le temps d'incorporation du *pool* d'AG de la proie dans celui du prédateur est variable et dépendant du *turnover* des tissus (Robin et al., 2003). Ce temps d'intégration est estimé à plusieurs semaines pour le muscle blanc des poissons, mais il dépend de l'AG et de l'espèce considérée (Mourente and Tocher, 1994). Par exemple, chez des turbots *Psetta maxima* d'environ 600 g, il faut plus de deux mois d'une alimentation identique pour que les profils en AG musculaires et hépatiques reflètent ceux de l'alimentation (Regost et al., 2003). Regost et al. (2003) indiquent aussi que l'effet de l'alimentation est plus marqué dans le foie que dans le muscle, et que dans les deux tissus les taux d'EPA et DHA des phospholipides sont moins influencés par l'alimentation que ceux des lipides neutres. Un *turnover* de durée similaire (deux mois et demi) a été observé dans le muscle et la graisse ventrale des saumons atlantique *Salmo salar* d'environ 300 g, mais cette fois sans séparer les lipides neutres et polaires, avec également des différences d'incorporation entre AG : le 18:2 ω 6 n'atteint jamais vraiment l'équilibre avec l'alimentation (Budge et al., 2011). Cependant, l'utilisation des compositions globales en AG (i.e. profils de nombreux AG) permet de limiter les erreurs de caractérisation des proies (Galloway et al., 2015).

3.2.3 Les isotopes stables du carbone et de l'azote

Deux atomes d'un même élément qui ont le même nombre de protons mais un nombre de neutrons différent sont appelés isotopes. Ils ont une masse atomique différente qui modifie leurs propriétés physicochimiques. Les isotopes stables sont ainsi nommés par opposition aux isotopes radioactifs : le noyau des isotopes stables ne produit aucune radioactivité permettant de dater des événements. En revanche, les principaux atomes des composés biologiques existent sous plusieurs formes isotopiques stables, dont l'abondance naturelle varie entre compartiments de la biosphère et au niveau des chaînes trophiques. L'utilisation des isotopes stables en

écologie trophique repose sur le fait que les isotopes légers sont préférentiellement utilisés puis excrétés dans les réactions chimiques du métabolisme que les isotopes lourds (Fry, 2007). Il en résulte une accumulation des isotopes lourds dans les tissus, qui s'amplifie à chaque niveau trophique : les individus dont les tissus sont plus riches en isotopes lourds, relativement aux isotopes légers, ont généralement un niveau trophique plus élevé (Fry, 1988). Le rapport isotopique d'un échantillon correspond au rapport d'abondances en isotope lourd et isotope léger. Il est généralement exprimé en comparaison à des standards internationaux, en unité de δ isotopique et en pour mille (‰). Dans le cas des isotopes stables du carbone et de l'azote, les plus communément utilisés dans le cadre d'études trophiques, la composition isotopique d'un échantillon correspond donc à :

$$\delta^{15}\text{N} \text{ ou } ^{13}\text{C} = \frac{R_{\text{échantillon}} - R_{\text{standard}}}{R_{\text{standard}}} \times 1000 \quad \text{avec } R = ^{15}\text{N}/^{14}\text{N} \text{ ou } ^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ respectivement.}$$

Comme les compositions isotopiques des tissus résultent de l'activité métabolique (i.e. excrétion préférentielle), de forts écarts au métabolisme basal peuvent impacter les compositions isotopiques notamment au travers du *turnover* des tissus, comme en période de forte croissance ou de jeûne. Ainsi, Varela et al. (2015) observent dans le foie de bonites *Sarda sarda* d'environ 500 g que la composition isotopique en azote ($\delta^{15}\text{N}$) augmente avec la durée du jeûne, et que celle en carbone ($\delta^{13}\text{C}$) devient plus variable. En revanche ces auteurs n'observent pas de changements dans le muscle durant les 45 jours de jeûne. Chez le thon *T. orientalis*, la croissance semble majoritairement affecter les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ dans le muscle (Madigan et al., 2012). Cependant, le *turnover* des isotopes stables est globalement plus lent que celui des acides gras et varie aussi selon le tissu considéré. Ainsi, Madigan et al. (2012) observent chez *T. orientalis* des *turnovers* compris entre 3 mois pour le $\delta^{15}\text{N}$ du foie et jusqu'à 8 mois pour le $\delta^{13}\text{C}$ du muscle blanc, sur des poissons compris entre 800 g et 162 kg.

La reconstruction des réseaux trophiques s'appuie sur la composition isotopique des organismes et des facteurs de discrimination, qui correspondent à la différence de composition isotopique entre les tissus d'un prédateur et celle de son alimentation. Cette différence a plusieurs origines, comprenant les transformations métaboliques propres à chaque organisme et le routage isotopique, c'est-à-dire une incorporation différente de la composition isotopique de l'alimentation selon la nature de ses composés (e.g. acides aminés essentiels ou non ; Martinez del Rio et al., 2009). Les facteurs de discrimination sont estimés autour de 1‰ pour le carbone et 3.4‰ pour l'azote, mais ces valeurs varient selon les niveaux trophiques, les espèces considérées ou la qualité des nutriments ingérées (McCutchan et al., 2003; Martinez del Rio et al., 2009). D'autre part, la composition isotopique du premier niveau trophique (i.e. la ligne de base, les autotrophes) est nécessaire à l'attribution des niveaux trophiques, et permet notamment des comparaisons entre écosystèmes dont la ligne de base peut être différente. Les variations géographiques de signatures isotopiques (i.e. "isoscapes") ont ainsi été utilisées pour tracer les mouvements de nombreuses espèces, bien que la variabilité spatio-temporelle de ces isoscapes ne soit pas encore totalement comprise (Graham et al., 2010). La matière organique particulaire est préconisée pour estimer la ligne de base et à la détermination de ses isoscapes, mais l'utilisation des consommateurs primaires est également possible. Plus récemment, la détermination de la signature isotopique de certains composés (i.e. Compound-Specific Stable Isotope Analyses, CSIA) comme les acides aminés ou les acides gras est venue compléter ces méthodes (McClelland and Montoya, 2002). Ainsi, Popp et al. (2007) puis Lorrain et al. (2015) ont validé l'utilisation des isotopes stables de l'azote sur des acides aminés spécifiques (i.e. CSIA-AA) chez *T. albacares*, en comparant les résultats obtenus à ceux utilisant le méso-zooplancton ou l'anatife *Lepas anatifera* (un cirripède vivant fixé aux DCP) comme ligne de base. Chez d'autres espèces, l'utilisation des CSIA sur les acides gras (i.e. CSIA-FA) a aussi été validée dans le cas d'études trophiques

(Bec et al., 2011), et a permis de déterminer des changements alimentaires ontogéniques chez le mullet *Liza saliens* (Koussoroplis et al., 2010), mais pour le moment cette méthode est moins utilisée chez les espèces hauturières dont l'environnement présente généralement moins de contrastes isotopiques en carbone que le milieu côtier.

Les principaux avantages et inconvénients des différentes analyses sélectionnées et utilisées par la suite dans cette étude sont résumés dans le tableau 3.1.

Table 3.1: Principaux avantages et inconvénients scientifiques et techniques de l'analyse de la composition proximale (classes de lipides et protéines), en acide gras (AG) et en isotopes stables (IS).

	Composition proximale	Composition en acides gras	Composition en isotopes stables
Avantages	Scientifique - information énergétique et fonctionnelle - convertible en énergie (Joules) - plusieurs données disponibles la littérature	- interprétation trophique et physiologique - complémentaire aux analyses isotopiques dans les études trophiques	- largement utilisé en écologie trophique, y compris chez les thons tropicaux - données isotopiques disponibles pour certaines proies dans la zone d'étude
	Tech. - analyses simples ne nécessitant pas d'équipement lourd		- relativement bon marché en comparaison aux analyses d'AG - conservation des échantillons facilitée par la possibilité de les lyophiliser
Inconvénients	Scientifique - difficultés d'interprétation des données bibliographique car les méthodes et unités ne sont pas standardisées	- connaissances limitées du métabolisme des AG et notamment du turnover chez les thons tropicaux - influence du métabolisme toujours possible sur la fraction neutre et de l'alimentation toujours possible sur la fraction polaire	- turnover isotopique des tissus non connu chez les thons tropicaux - la composition isotopique de la ligne de base demande un échantillonnage spécifique et régulier non disponible - le fractionnement isotopique entre niveaux trophiques n'est pas connu
	Tech. - faible précision et répétabilité analytiques - nécessite un stockage et un broyage sur tissus congelés car les lipides se dégradent rapidement	- nécessite un stockage congelés car les AG se dégradent rapidement (stockage -80°C, azote liquide pour le broyage...) - long et coûteux, surtout en séparant les fractions - demande un équipement lourd spécifique	- influence du taux de lipides sur la composition isotopique en carbone (délipidation nécessaire) - demande un équipement lourd spécifique

Chapitre 4

Échantillonnage et protocoles d'analyse des tissus

4.1 Sélection des thons, mesures morphométriques et prélèvement des tissus

Les échantillons des trois espèces de thon ont été récoltés en 2013 au débarquement des thoniers senneurs au port de Victoria (Seychelles) et proviennent de l'ouest de l'océan Indien. Ces poissons ont donc tous été conservés congelés dans de la saumure à bord des thoniers, mais cette méthode de stockage n'a pas d'incidence sur les traceurs écologiques étudiés ici (Bodin et al., 2014). De manière à couvrir un large panel de conditions environnementales (i.e. saisons et zones) et biologiques (i.e. niveau de maturité, sexe, taille), les thons ont été sélectionnés en deux étapes :

(i) selon leur origine géographique. Grâce aux données consignées dans les carnets de bord par les patrons de pêche, il est possible d'obtenir les coordonnées géographiques et la date de chaque activité de pêche. Cependant les poissons issus de plusieurs activités de pêche peuvent être stockés en mélange dans les cuves réfrigérées des bateaux. Pour limiter l'incertitude sur la date et les coordonnées de pêche, seules les cuves présentant le moins de mélange ont été échantillonnées (i.e. activité de pêche unique ou mélange de 2 à 6 activités proches dans le temps et l'espace);

(ii) selon des critères de taille, de manière à couvrir une large gamme de taille pour chaque espèce.

Ainsi, 223 thons obèses (BET), 230 thons jaunes (YFT) et 178 bonites à ventre rayé (SKJ) ont été sélectionnés. L'activité de pêche est connue avec exactitude pour 223 poissons (i.e. une seule activité de pêche stockée dans la cuve échantillonnée), et l'incertitude maximale est de 20 jours, 4.6° latitude et 7.5° longitude et concerne 15 poissons. En cas d'incertitude, les caractéristiques moyennes des activités de pêche en question ont été considérées, c'est-à-dire la date et les coordonnées géographiques moyennes (qui ne correspondent donc pas à une activité de pêche réelle) (Fig. 4.1).

La dissection des thons s'est faite dans le laboratoire humide de la Seychelles Fishing Authority (Victoria, Seychelles). Différentes mesures morphométriques ont été prises sur chaque poisson sélectionné (Tableau 4.1). Lors de la dissection, chaque organe est pesé séparément (foie, gonades, viscères, estomac, Tableau 4.1), et le poids somatique alors estimé en enlevant le poids de l'ensemble des viscères et organes à celui du poids total. Les gonades sont inspectées visuellement afin de déterminer le sexe des individus. Les individus immatures

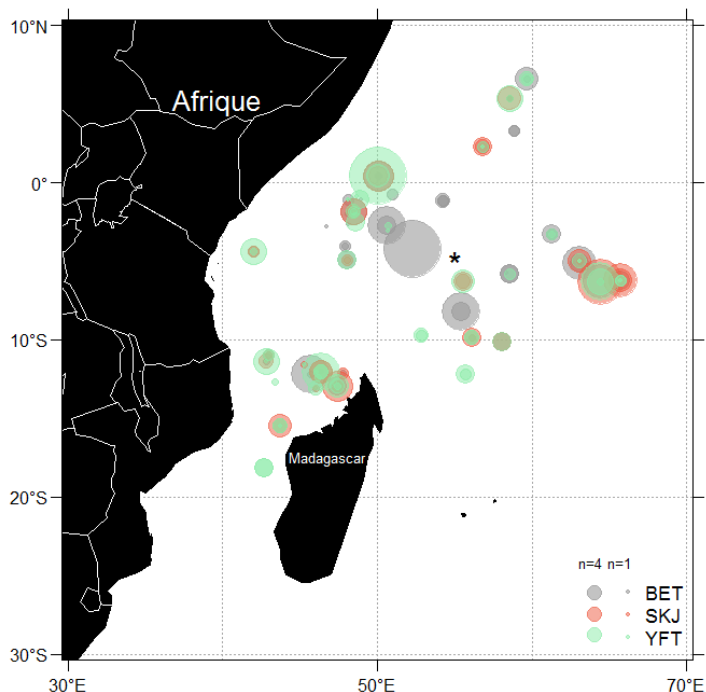


Fig. 4.1: Origine géographique des 223 *T. obesus* (BET), 230 *T. albacares* YFT et 178 *K. pelamis* (SKJ) échantillonnés en 2013 au débarquement des thoniers senners au port de Victoria, Seychelles (indiqué par l'étoile).

n'ayant pas des gonades suffisamment développées ne peuvent pas être sexés et sont catégorisés comme "indéterminés". Pour les individus pouvant être sexés, un stade de maturité entre 1 et 5 est également attribué, correspondant au niveau de maturité utilisé par les commissions thonières (Stade 1 : individus immatures, Stade 2 : début de la maturation, Stade 3 : maturation, Stade 4 : fin de la maturation et Stade 5 : post-ponte et phase de réabsorption, Brown-Peterson et al. (2011) et Annexe A).

Finalement, une partie des poissons disséqués a été sélectionnée pour analyses des tissus. Pour cela, deux échantillons d'environ 2 g (poids humide) ont été prélevés sur chacun des quatre tissus d'intérêt : le muscle blanc (sur le côté gauche du poisson, sous la première épine dorsale), le muscle rouge (sous les nageoires pectorales), le foie et les gonades (pour les individus suffisamment matures). Ces échantillons ont été stockés à la Seychelles Fishing Authority dans des cryotubes à -80°C.

Table 4.1: Les mesures morphométriques et somatiques relevées sur chaque thon échantillonné.

Nom	Notation	Unité	Précision	Détail de la mesure
Taille à la fourche	FL	cm	0.5	Longueur, de la bouche fermée à l'échancrure de la queue
Poids total	WT	kg	0.1	Poids du poisson entier
Circonférence	TG	cm	0.5	Circonférence, mesurée sous les nageoires pectorales
Longueur à la première dorsale	LD	cm	0.5	Longueur, de la bouche fermée à la première épine dorsale
Poids des gonades	W_G	g	0.1	Poids cumulé des 2 gonades
Poids du foie	W_L	g	0.1	
Poids de l'estomac plein		g	0.1	Sauf en cas de dévagination lors de la pêche
Poids de l'estomac vide		g	0.1	
Poids des viscères		g	0.1	Viscères restantes (hors gonades, foie et estomac)

4.2 Protocoles d'analyse des tissus

L'ensemble des analyses présentées ci-après a été réalisé sur les quatre tissus des poissons sélectionnés. Un des deux échantillons de tissu est lyophilisé en vue de l'analyse isotopique, tandis que le second est maintenu à -80°C puis broyé à froid en vue de l'analyse des lipides, protéines et acides gras (Fig. 4.2).

Le broyage à froid est effectué sous azote liquide. Chaque échantillon congelé d'environ 2 g est placé dans une feuille en aluminium formant une papillote, puis broyé sur une plaque en métal à l'aide d'un marteau. Tous les ustensiles (i.e. plaque en métal, marteau et entonnoir pour récupérer la poudre de tissu) et les échantillons sont passés dans l'azote liquide avant le début du broyage et autant de fois que nécessaire, de manière à ce que l'échantillon ne décongèle pas. Une fois finement broyé, l'échantillon est transféré dans un tube eppendorf et conservé à -80°C .

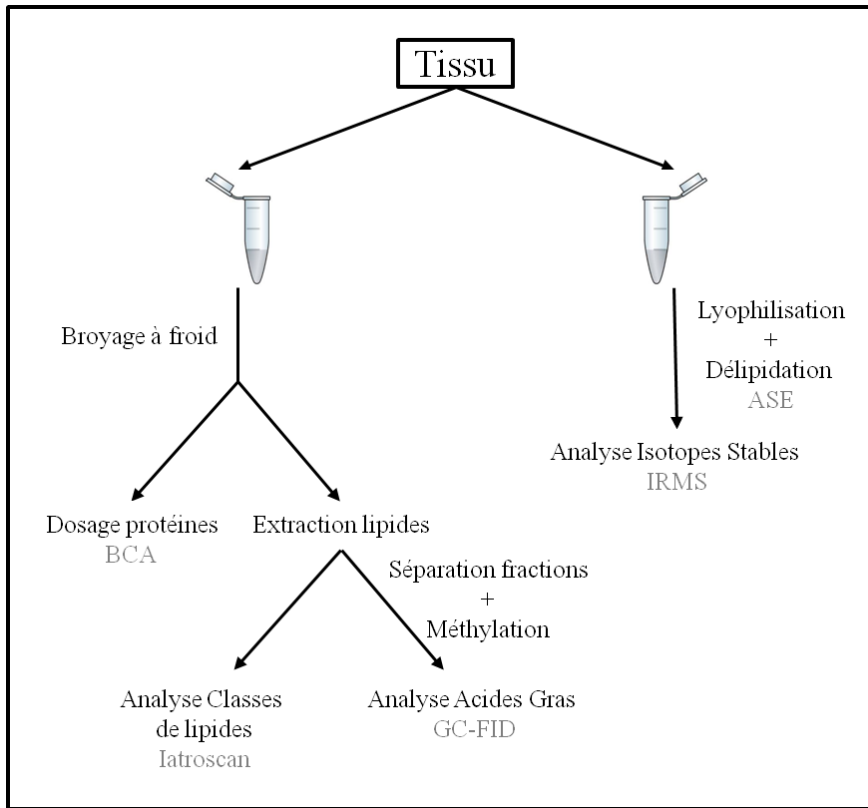


Fig. 4.2: Analyses effectuées à partir de chaque échantillon de tissu prélevé. En gris figurent les techniques d'analyses utilisées : BCA=dosage par l'acide bicinnoïque; Iatroscan=type de chromatographie en couche mince couplée à un détecteur à ionisation de flamme; GC-FID= chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme; IRMS=spectromètre de masse de ratios isotopiques; ASE=Extraction par solvant accélérée.

4.2.1 Extraction et analyses des classes de lipides et acides gras sur tissu frais

Les lipides totaux ont été extraits à partir des tissus frais par la méthode de Folch et al. (1957) à la plateforme MetaToul-Axiom de l'INRA à Toulouse.

Matériel : Gants en nitrile, tubes FastPrep® (tubes contenant des micro-billes de céramique, MP Biomedicals), pipettes pasteur, vials en pyrex 11.5 ml avec bouchon (Sigma-Aldrich), azote liquide et gazeux.

Balance analytique, vortex et broyeur FastPrep 5G (broyeur au mouvement multidirectionnel), centrifugeuse 3K30 (SIGMA).

Solvants : Folch [Dichloromethane:Methanol 2:1 (v/v)], KCl aqueux à 0.9% (w/v)

Méthode : Environ 250 ± 50 mg de tissu frais sont pesés dans un tube FastPrep puis broyés dans 2 ml de Folch en utilisant un broyeur FastPrep (3 séries de broyage de 30 secondes intercalées de brefs passages dans l'azote liquide pour éviter l'échauffement des tissus). L'extrait est transféré dans un vial avec 600 μ l de KCl, puis vigoureusement mélangé avec un vortex et centrifugé pendant 10 min à 2200 rpm à 20 °C. La couche inférieure, contenant les lipides totaux, est collectée puis partagée en deux sous-échantillons de 700 μ l chacun en vue de l'analyse des classes de lipides pour le premier et de l'analyse des acides gras pour le second sous-échantillon. Ces sous-échantillons sont refermés sous flux d'azote et stockés à -20 °C jusqu'à analyse des classes de lipides ou séparation/méthylation pour l'analyse des acides gras (durée du stockage avant analyse inférieure à 2 mois).

Classes de lipides

Les lipides totaux ont été séparés par chromatographie en couche mince (utilisant la silice comme phase stationnaire solide) et analysés par un détecteur à ionisation de flamme (i.e. Iatroscan, TLC-FID) en utilisant la méthode de Parrish (1999) au plateau technique "Biochimie" de l'UMR MARBEC à Sète. Cette méthode permet la séparation de différentes classes de lipides selon leur polarité : la migration est plus ou moins rapide selon la polarité de l'éluant (ici quatre bains aux polarités différentes sont utilisés). Les concentrations de six classes de lipides ont été déterminées : les triacylglycerols (TAG), les acides gras libres (FFA), les stérols (ST), les stérols estérifiés et cires (SE-WE), les phospholipides totaux (PL) et les lipides polaires mobiles dans l'acétone (AMPL), et exprimées en $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ de poids frais. La précision analytique de cette technique est de $\pm 12\%$ (Pethybridge et al., 2014).

Matériel : Gants en nitrile, seringue en verre de 5 μ l (Hamilton), 10 chromarodes SIII sur leur support en inox (bâtonnets couverts de silice, Bionis).

4 cuves en verre avec papier buvard, Iatroscan MK-6 (Iatron Laboratories Ltd.), logiciel Peak-Simple 3.93 (SRI).

Solvants : Dichlorométhane, Hydrogène pour le détecteur FID du Iatroscan. Solution standard contenant 0.63 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de glycéryl tripalmitate (TAG), 0.3 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ d'acide oléique (FFA), 0.32 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de cholestérol (ST), 0.16 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de cholesteryl palmitate (SE-WE) et 1.88 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de phosphatidil choline (PL) dans du dichlorométhane.

4 bains de migration: (A) Hexane/Diethyl-éther/Acide formique, 99:1:0.05 (v/v) (B) Hexane/Diethyl-éther/Acide formique 80:20:1 (v/v) (C1) Acétone 100% et (C2) Chloroforme/Méthanol/Eau milli- Ω 5:4:1 (v/v).

Méthode : Avant le début de chaque manipulation, les chromarodes sont nettoyées par deux passages à blanc au Iatroscan. Puis, un aliquote des lipides totaux extraits est évaporé à sec sous flux azote puis ressuspendu dans un volume connu de dichlorométhane (généralement 200 µl pour le muscle blanc, 800 µl pour le muscle rouge, 400 à 1000 µl pour les gonades et 1000 à 1600 µl pour le foie). Un volume de 5 µl d'extrait est ensuite déposé au goutte à goutte sur une chromarode avec une seringue en verre. Sur une des 10 chromarodes, 5 µl de solution standard sont déposés à la place d'un échantillon. Entre chaque échantillon, la seringue est rincée 5 fois dans du dichlorométhane. Les classes de lipides sont séparées par un développement en trois étapes et les classes sont quantifiées au Iatroscan entre chaque développement. Les chromarodes sont donc placées successivement dans des cuves en verre contenant différents bains de migration (quelques cm au fond de la cuve) : (A) 25 min dans le bain A; (B) 40 min dans le bain B; puis (C1) 15 min dans le bain C, suivi de deux passages de 10 min dans le bain C2. Le signal est détecté au Iatroscan en millivolts et quantifié en utilisant des standards au temps de migration et aux concentrations connues.

Acides gras des fractions neutres et polaires

A partir d'un extrait de lipides totaux, les lipides neutres et polaires ont été séparés par extraction sur phase solide (SPE; i.e sur une colonne de silice) puis méthylés au Boron trifluoride selon la méthode de Metcalfe and Schmitz (1961). Cette opération a pour but de séparer les AG de la tête polaire des phospholipides ou du glycérol des triacylglycérol, et de remplacer ces groupements par un groupe méthyl (-CH₃), afin de rendre les AG plus stables et détectables par les instruments de mesure. Les AG méthylés ont ensuite été séparés par chromatographie en phase gazeuse et détectés avec un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID), et sont donc exprimés en % du total des AG méthylés identifiés dans chaque fraction. L'identification des AG méthylés se fait par comparaison avec des temps de migration entre échantillons et standards commerciaux aux compositions connues. Toutes les analyses ont été effectuées à la plateforme MetaToul-Axiom de l'INRA à Toulouse.

Matériel : Gants en nitrile, vials en pyrex à visser 11.5 ml avec bouchon (2 par extrait de lipides totaux, Sigma-Aldrich), flacons en verre à visser 1.5 ml avec capuchon en silicone et insert (2 par extrait de lipides totaux, Macherey-Naagel), pipettes graduées en verre 10 ml, pipettes pasteur, pipette à répétition, cartouches en verre de 3 ml contenant 200 mg de silice non modifiée (1 par extrait de lipides, SPE Chromabond[®], Macherey-Nagel).

Module d'extraction sous vide 12 postes, évaporateur à flux d'azote N-Evap 111 (OA-SYS), centrifugeuse 3K30 (SIGMA), étuve à 56°C, bloc chauffant à 80°C (Stuart), Chromatographie en phase gazeuse TRACE 1310 couplée à un détecteur à ionisation de flamme (Thermo Scientific) équipée d'une colonne FAMEWAXTM (30 m, diamètre interne de 0.32 mm, Restek), logiciel Xcalibur 2.2 (Thermo Scientific).

Solvants : 1. Séparation des fractions : Dichlorométhane et méthanol, dichlorométhane:méthanol 98:2 (v/v), dichlorométhane:méthanol 1:1 (v/v), acétate d'ammonium 0.2 M dans du méthanol ;
2. Méthylation : KOH-méthanol 1.5 M, Boron trifluoride BF₃-méthanol 10% wt, heptane, eau milli-Ω ;
3. Analyse chromatographique : Heptane, acétate d'éthyle et standards de méthyles d'acide gras (PUFA FAME Mix (Menhaden oil) et Food Industry FAME Mix, Restek).

Méthode :

1. Séparation des fractions : Après activation de la silice avec 1 ml de dichlorométhane, environ 50 μ l d'extrait de lipides totaux est déposé sur une cartouche SPE montée sur un module d'extraction sous vide. La fraction de lipides neutres est éluée avec 2 ml de dichlorométhane:méthanol 98:2 (v/v) dans un premier vial. La fraction de lipides polaires est éluée dans un second vial avec 1 ml de dichlorométhane puis 2 ml d'acétate d'ammonium. Les vials sont fermés avec un flux d'azote puis stockés à -20°C.
2. Méthylation : Les deux fractions sont hydrolysées dans 1 ml de KOH-méthanol, fermées sous flux d'azote puis vortexées et chauffées à l'étuve 30 min à 56°C. Pour la méthylation, 1 ml d'heptane et 1 ml de BF₃-méthanol sont ajoutés dans les vials, qui seront fermés sous flux d'azote, vortexés et placés sur un bloc chauffant 60 min à 80°C. A l'issue de la méthylation, 1 ml d'eau milli- Ω et 2 ml d'heptane sont ajoutés, les vials sont alors vigoureusement agités puis centrifugés 5 min à 2200 rpm à 20°C. La couche supérieure, contenant les acides gras méthylés, est alors récupérée avec une pipette pasteur.
3. Analyse chromatographique : Après évaporation à sec, les fractions d'acides gras méthylés sont reprises dans 200 μ l d'heptane dans des flacons 1.5 ml, puis analysées en chromatographie en phase gazeuse. Les paramètres utilisés pour la chromatographie sont résumés ci-dessous. Entre chaque échantillon, la seringue est rincée 5 fois avec de l'heptane et 5 fois avec de l'acétate d'éthyle. Les pics détectés sont identifiés en comparant les temps de rétention à ceux connus dans les deux standards commerciaux utilisés, à l'aide d'un logiciel spécialisé. Un total de 27 acides gras méthylés ont pu être identifiés dans les tissus de thons tropicaux.

Paramètres utilisés pour la chromatographie GC-FID :

Gaz vecteur : Hélium à flux constant de 1 ml.min⁻¹

Injection : Mode "Splitless"

Température injecteur : 225°C

Volume d'échantillon injecté : 1 μ l

Débit purge du septum : 5 ml.min⁻¹

Détection : Température détecteur FID : 250°C

Débit d'hydrogène : 35 ml.min⁻¹

Débit d'air : 350 ml.min⁻¹

Programme de température du four : 1 min à 130°C puis 2 °C.min⁻¹ jusqu'à 245 °C et 8 min à 245 °C.

Durée totale d'une analyse : 66.5 min

4.2.2 Dosage des protéines

Le contenu en protéines de chaque échantillon frais a été dosé à la plateforme de l'INRA à Toulouse, par une méthode de spectrométrie optique utilisant l'acide bicinchoninique (BCA) comme réactif (Smith et al., 1985). Ce dosage colorimétrique est basé sur une réaction en deux étapes : (1) réduction du Cu^{2+} en Cu^+ par les protéines (réaction de Biuret), et (2) complexation que forme le BCA et le Cu^+ . L'intensité de la coloration est proportionnelle au nombre de réductions, qui dépend de la quantité de protéines et notamment des acides aminés particulièrement réducteurs. Cette méthode présente l'avantage d'être applicable sur une large gamme de concentrations et d'être peu sensible à des substances interférentes (détergents notamment): un tampon de lyse à 2 % de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) a été utilisé pour limiter l'influence de certains lipides contenus dans l'échantillon (Morton and Evans, 1992), dont l'absorbance est proche de celle du complexe BCA- Cu^+ (Kessler and Fanestil, 1986). Les taux de protéines sont exprimés en mg.mg^{-1} de poids frais et les réplicats réalisés sur 266 échantillons ont permis d'estimer la variabilité de cette méthode sur les tissus de thon à 11.6 %.

Matériel : Gants en nitrile, tubes eppendorf 2 ml, billes en céramiques (diamètre 4 mm), plaques "96 puits" transparentes (Greiner).

Pipette à répétition, broyeur à billes MM400 (Retch), centrifugeuse 5415R (Eppendorf), étuve à 37°C, spectromètre optique et lecteur de plaque Infinite 200 (TECAN), logiciel MAGELLAN (TECAN).

Solvants : Tampon de lyse (2% de Sodium Dodecyl Sulfate; 1% triton; eau milli-Ω), réactifs BCA (préparés juste avant analyse, pour 60 échantillons : 14 ml de réactif A pour 280 µl de réactif B), Solutions de Bovine Serum Albumine (BSA, de 200, 400, 600, 800 et 1000 mg.l^{-1} diluées dans le tampon de lyse).

Méthode : 15 ± 5 mg de tissu frais préalablement broyé sont déposés dans un tube, puis 500 µl de tampon de lyse à 2% de SDS et une bille en céramique y ont été ajoutés. Le volume de tampon de lyse est relativement faible mais le SDS est un détergeant fort et très moussant qui risquerait de faire ouvrir les tubes lors du broyage s'il est présent en trop grande quantité. Le contenu est ensuite broyé pendant 3 min au broyeur à billes à une fréquence de 19 coups par seconde puis centrifugé pendant 50 min à 1300 rpm à 4°C. Lorsqu'elle est présente, la pellicule blanche de surface contenant les lipides est aspirée en utilisant un cône de pipette monté sur une pompe à vide. L'échantillon est ensuite dilué par 15 dans le même tampon de lyse que précédemment. Enfin, 25 µl de l'extrait dilué puis 200 µl de réactif BCA sont déposés dans un puits de plaque "96 puits" avec une pipette à répétition. Dans 6 puits, l'extrait est remplacé par les solutions étalon de BSA, puis la plaque est refermée et incubée 30 min à 37 °C. A l'issue de l'incubation, les éventuelles bulles ont été percées à l'aide d'une aiguille chauffée. L'absorbance à 562 nm est lue 125 fois par échantillon au spectromètre optique. A partir des absorbances mesurées pour la gamme étalon et de la droite de régression qui en découle, les contenus en protéines sont calculés puis corrigés de la dilution et de la masse de tissu initialement pesée afin d'obtenir la concentration en protéines du tissu.

4.2.3 Isotopes stables du carbone et de l'azote

Les isotopes stables du carbone et de l'azote ont été analysés simultanément à la plateforme Spectrométrie Isotopique de l'UMR LIENSs à La Rochelle, à partir de tissus préalablement préparés (lyophilisés, broyés, délipidés et pesés) au plateau technique "Biochimie" de l'UMR MARBEC à Sète. La lyophilisation est nécessaire pour l'analyse par IRMS (la concentration des éléments est sous estimée en présence d'eau) et permet de conserver plus facilement les tissus. D'autre part, elle n'altère pas la composition isotopique des tissus (Bessey and Vanderklift, 2014).

Les lipides ont été extraits chimiquement par méthode semi-automatisée (Extraction par Solvant Accélérée, ASE) en utilisant uniquement du dichlorométhane suivant la méthode décrite par Bodin et al. (2009). Cette méthode sous haute pression et température permet une meilleure extraction des lipides et est plus répétable et rapide qu'une extraction manuelle (Macnaughton et al., 1997). De plus, l'utilisation d'un solvant de faible polarité (1.14 D) permet d'extraire les lipides neutres (dont le contenu peut varier fortement selon les individus) tout en limitant l'extraction de lipides polaires liés à des molécules azotées (e.g. lipo-protéines ou protéines trans-membranaire), dont la perte pourrait affecter la composition isotopique en azote (Bodin et al., 2009).

Cependant, la délipidation chimique des tissus reste longue (préparation et nettoyage des cellules d'extraction), coûteuse et polluante (déchets de solvant). Une méthode de correction mathématique pour s'en affranchir a donc été recherchée, et fait l'objet du manuscrit A. Pour cela, la composition isotopique d'une partie des échantillons bruts (i.e. avant extraction chimique des lipides) a aussi été analysée en isotopie.

Matériel : Gants en nitrile, papier absorbant, billes en inox (diamètre 4 mm, Thermofischer) et barreau aimanté, perles de verre (diamètre 1-1.5 mm), filtres de cellulose (Restek), pinces et spatules en inox, feuilles d'aluminium, vials en verre 20 ml avec bouchon et septum, capsules en étain 5*8 mm² (SyLab), plaques "96 puits".

Lyophilisateur ALPHA 1-2 (Thermo Scientific), broyeur à billes MM200 (Retch), balance analytique Adventurer Pro (OHAUS), évaporateur à flux d'azote N-Evap 111 (OA-SYS), automate d'extraction ASE 200 (Accelerated Solvent Extraction, Dionex) avec cellules de 11 ml (dont frités + joints peek), four à moufle, bain à ultra-sons, micro-balance XP6 (Metler-Toledo), Spectromètre de Masse de Ratio Isotopique (IRMS) Delta V Advantage couplé à un analyseur élémentaire Flash EA 1112 (Thermo Scientific).

Solvants : Dichlorométhane (stabilisé à l'éthanol), acétone pour le nettoyage des ustensiles, détergeant pour le nettoyage des vials.

Méthode :

1. Broyage : Après lyophilisation (environ 24 h pour 80 tubes de 2 g), les tissus ont été homogénéisés au broyeur à billes (2 billes par cryotube rempli aux $\frac{2}{3}$) mais un broyage manuel préalable, à l'aide d'une spatule, est généralement nécessaire pour faciliter le broyage.
2. Extraction des lipides : Pour chaque échantillon, les lipides de 350 ± 100 mg de poudre ont été extraits en utilisant 8 ml de dichlorométhane à 100°C et à une pression de 1900 psi pendant 10 min (voir résumé p. 63). Pour cela chaque échantillon est pesé et conditionné dans une cellule ASE, entre un filtre en cellulose et des perles de verre, suivant le mode opératoire fourni avec l'ASE. A l'issue de l'extraction, les échantillons délipidés sont récupérés en vidant la cellule ASE sur une feuille en aluminium (cette étape permet d'enlever les perles de verre) puis sont ensuite stockés en salle sèche jusqu'à l'encapsulation.

Le dichlorométhane contenu dans les extraits lipidiques récupérés dans des vials a été évaporé en utilisant un extracteur à flux d'azote, et les extraits secs pesés à 0.1 mg de manière à obtenir le pourcentage en lipides de l'échantillon sec (poids du vial avec extrait lipidique moins poids du vial vide). A l'issue de l'extraction, les vials sont nettoyés avec un détergeant puis passés 4h au four à moufle à 350 °C pour éliminer toute trace résiduelle de lipides. Les cellules ASE et les frités sont nettoyés au dichlorométhane, exceptés les joints peek qui sont nettoyés dans de l'eau milli-Ω au bain à ultra-sons pendant 15 min.

3. Encapsulation : 0.4 ± 0.1 mg d'échantillon délipidé a été pesé sur une microbalance, puis encapsulé dans une capsule en étain à l'aide de spatules et pinces préalablement nettoyées à l'acétone, puis conditionné dans une plaque "96 puits", fermée avec une feuille d'aluminium.
4. Analyse isotopique : Les principales conditions analytiques sont données dans le résumé ci-dessous. Les résultats isotopiques sont notés en unité δ et exprimés en pour mille (‰), relativement aux standards internationaux (Vienna-Pee Dee Belemnite pour le carbone et l'azote atmosphérique pour l'azote). La calibration de l'IRMS est basée sur des matériaux de référence (USGS- 24, IAEA-CHE, -600 pour le carbone; IAEA-N₂, -NO₃, -600 pour l'azote). Sa précision analytique estimée à partir de mesures répétées sur des standards internes (acétanilide et peptone) était < 0.15 ‰ pour les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$. Les ratios C:N sont exprimés en % du poids de l'élément.

Paramètres ASE utilisés (Bodin et al., 2009) :

Solvant : Dichlorométhane (CH_2Cl_2)
 Température/Pression : 100 °C / 1900 psi
 Durée de chauffage de la cellule : 10 min
 Durée de la phase statique : 10 min
 Durée de la purge : 1 min
 Nombre de cycles en phase statique : 1
 Durée totale : 20 min
 Volume total de solvant utilisé : < 30 ml

Paramètres EA-IRMS utilisés à la plateforme du LIENSs :

Température du four de combustion : 900 °C
 Température du four de réduction : 650 °C
 Température de la colonne de chromatographie : 45 °C
 Gaz vecteur : Hélium
 Gaz de combustion : Oxygène

Partie III

Résultats

Chapitre 5

Méthodes de normalisation des lipides pour l'analyse isotopique des tissus de thon

Les compositions isotopiques des tissus mous sont fréquemment utilisées pour préciser la position trophique des individus au sein d'un écosystème. Cependant, la présence de lipides dans les échantillons peut fortement affecter leurs compositions isotopiques en carbone, car les lipides contiennent proportionnellement plus d'isotope léger du carbone (le ^{12}C) que les autres composés des tissus, comme les protéines ou le glycogène (DeNiro and Epstein, 1977). Or les lipides sont la forme majoritaire de stockage de l'énergie chez les poissons et leurs taux peuvent donc fortement varier entre espèces, tissus, mais aussi entre saisons ou zones de migration, menant à de possibles erreurs d'interprétation trophique et écologique. Pour des raisons de normalisation, les lipides sont généralement extraits des échantillons par des méthodes chimiques avant l'analyse au spectromètre de masse, ou des équations mathématiques sont utilisées pour corriger la valeur obtenue sur le tissu "brut". Les deux approches présentent des avantages et des inconvénients : les méthodes de délipidation chimique permettent de s'assurer de l'absence de lipides mais sont plus fastidieuses et coûteuses, et peuvent, selon la méthode d'extraction utilisée, affecter la composition isotopique en azote (e.g. en extrayant des lipo-protéines ; Bodin et al., 2009). Les méthodes mathématiques consistent en des équations qui permettent de corriger spécifiquement la composition isotopique en carbone du tissu brut de celle des lipides, sans affecter la signature isotopique en azote. Cependant, si la correction mathématique n'est pas adaptée, ces équations peuvent produire des résultats "corrigés" erronés (e.g. Sweeting et al. 2006).

Dans le but de faciliter et de standardiser les futures études isotopiques chez les thons tropicaux, ce chapitre s'est consacré à la comparaison de différents types d'équation de correction. Comme aucune équation n'existait pour les tissus de thon tropicaux, nous avons donc estimé des équations permettant de s'affranchir d'une délipidation chimique pour les quatre tissus sélectionnés (muscles blanc et rouge, foie, gonades), à partir de trois grands types de modèles proposés dans la littérature (modèle linéaire, non-linéaire et "bilan de masse") et en comparant les résultats obtenus après une délipidation chimique et après les corrections mathématiques. Dans un premier temps, la qualité prédictive de ces modèles a été testée en utilisant des paramètres de la littérature pour des espèces proches (e.g. thon rouge). Dans un second temps, le jeu de données a été divisé en deux : une partie servant à l'ajustement des paramètres de chaque modèle, la seconde

partie servant ensuite à tester la qualité de prédiction de chaque modèle.

Les résultats obtenus ont permis de montrer que (i) la délipidation chimique au dichlorométhane, un solvant de faible polarité, n'affectait pas la composition isotopique en azote des échantillons, comme cela a déjà été montré chez des espèces plus grasses (Bodin et al., 2009). Ce point est apparu particulièrement utile dans le cas de problématiques nécessitant aussi une connaissance du taux de lipides (e.g. étude du statut énergétique); (ii) quelque soit le type de correction mathématique utilisé, l'utilisation de paramètres issus de la littérature a produit des résultats significativement différents de ceux obtenus après une délipidation chimique. L'utilisation de paramètres issus de la littérature, même d'espèce proche, conduit donc à des résultats erronés. Nous la déconseillons fortement pour nos trois espèces de thons; (iii) le bon ajustement des équations de correction nécessitait d'être tissu-spécifique, probablement à cause des différences de compositions biochimiques et/ou métaboliques entre tissus; (iv) dans le cas de tissus n'excédant pas 45% de lipides en poids sec, un modèle linéaire dont l'estimation des paramètres reste simple, a permis des corrections fiables du taux de lipides pour les quatre tissus testés.

En vue d'études trophiques sur les thons tropicaux, une délipidation est particulièrement nécessaire pour les tissus les plus gras et peut être soit: (i) chimique, en utilisant uniquement du dichlorométhane, permettant ainsi de connaître le taux de lipides des tissus; ou (ii) mathématique en utilisant une équation de correction linéaire pour chaque tissu, ajustée empiriquement sur un sous-échantillon du jeu de données.

Manuscrit A : paru dans *Rapid Communications in Mass Spectrometry* (DOI : 10.1002/rcm.7215).

Methods of lipid-normalization for multi-tissue stable isotope analyses in tropical tuna¹

Fany Sardenne^{1,2}, Frédéric Ménard³, Maxime Degroote¹, Edwin Fouché^{1,4}, Gaël Guillou⁵, Benoit Lebreton⁵, Stephanie Hollanda⁶, Nathalie Bodin²

¹ IRD, UMR MARine Biodiversity Exploitation and Conservation (MARBEC), Avenue Jean Monnet, Sète, FRANCE.

² IRD, UMR MARBEC, Fishing Port, Victoria, SEYCHELLES.

³ IRD, Mediterranean Institute of Oceanography (MIO), Aix-Marseille Université/CNRS/IRD/Université de Toulon, 13288 Marseille, FRANCE.

⁴ INRA, UMR TOXALIM (Research Centre in Food Toxicology), Toulouse, FRANCE.

⁵ CNRS-Université de la Rochelle, UMR Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), 2 rue Olympe de Gouges, F-17000 La Rochelle, FRANCE.

⁶ Seychelles Fishing Authority (SFA), Fishing Port, Victoria, SEYCHELLES.

Key-words: Carbon, Nitrogen, C:N, lipid correction, large pelagic fish, trophic ecology.

5.1 Abstract

Rationale: The bias associated with lipid contents in fish tissues is a recalcitrant topic for trophic studies using stable isotopes. Lipids are depleted in heavy carbon isotope and lipid content varies considerably among species, tissues and in both time and space. We applied and assessed here different correction methods for tropical tuna tissues.

Methods: We tested two types of normalization methods to deal with variable lipid content in liver, gonads, white and red muscles of yellowfin, bigeye and skipjack tuna: a chemical extraction using dichloromethane and a mathematical correction based on three modeling approaches (linear, non-linear and mass balance models). We measured isotopic values of bulk and lipid-free tissues and assessed the predictive ability of the correction models with the lipid-free measurements. Models' parameters were estimated from our dataset and stemmed from published studies on other species.

¹ <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rcm.7215>

CHAPITRE 5. MÉTHODES DE NORMALISATION DES LIPIDES POUR L'ANALYSE ISOTOPIQUE DES TISSUS DE THON

Results: Comparison between bulk, lipid-free and lipid-corrected isotopic values demonstrated that (1) chemical extraction using dichloromethane did not affect $\delta^{15}\text{N}$ values; (2) change in $\delta^{13}\text{C}$ values after extraction was tissue-specific; (3) lipid-normalization models using published parameters' estimates failed to predict lipid-corrected $\delta^{13}\text{C}$ values ; (4) linear and non linear models using parameters estimated for each tissue from our dataset provided accurate $\delta^{13}\text{C}$ predictions for all tissues, and mass balance model for white muscle only.

Conclusion: Models using published parameters' estimates from other species cannot be used. According to a range of lipid content that do not exceed 45%, we recommend the linear model to correct bulk $\delta^{13}\text{C}$ values in the investigated tissues but parameters have to be estimated from a proportion of the original data for which chemical extraction is required and isotopic values of bulk and lipid-free tissues are measured.

5.2 Introduction

Stable isotope analysis (SIA) is a widespread tool in trophic ecology, frequently used to understand how marine food webs are structured and how marine ecosystems function (Michener and Schell, 1994). The isotopic approach is based on a predictable relationship between a consumer and its preys, i.e. a stepwise enrichment in heavier isotope. With a low enrichment factor between trophic levels, carbon isotope ratios ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, expressed as $\delta^{13}\text{C}$) allow for discriminating different sources of primary production (e.g. nearshore vs. offshore systems, or benthic vs. pelagic systems) while nitrogen ratios ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, expressed as $\delta^{15}\text{N}$) provide an index of animal's trophic position due to preferential retention of ^{15}N during metabolism and excretion, and consequently a higher enrichment in $\delta^{15}\text{N}$ value between diet and consumer. Although the use of SIA has greatly improved the understanding of predator-prey interactions and trophic dynamics in marine environment, some limitations have also been pointed out because of ecosystem complexity, and variation in isotopic fractionation as well as tissue growth and isotopic turnover (e.g., Miller, 2006; Jardine et al., 2004; Sherwood et al., 2007; Trueman et al., 2005; Lee Cruz et al., 2012; Hussey et al., 2014).

For the sake of standardization and of result comparability, trophic studies on fish using stable isotopes are recommended to be conducted on one particular tissue, usually white muscle due to its relative biochemical homogeneity and stability (Pinnegar and Polunin, 1999). In contrast, species-specific studies such as diet shift experiments have highlighted the strong need and interest to work on multiple tissues with different turnover rates (MacNeil et al., 2005; Logan et al., 2006; Guelinckx et al., 2007; Buchheister and Latour, 2010; Madigan et al., 2012). Beyond different turnover rates, tissue-specific isotopic signatures are also attributed to their biochemical composition, i.e., lipid and protein contents and their constituents fatty acids and amino acids (Kurle et al., 2014; Jardine et al., 2005). The tissue-specific allocation of these dietary components with different isotopic signatures largely influences the tissues' isotopic signatures (i.e., "isotopic routing", Martinez del Rio et al., 2009; Kelly and Del Rio, 2010).

Lipids are depleted in ^{13}C relative to protein and glycogen due to the different biochemical pathways involved in their respective synthesis (DeNiro and Epstein, 1977). Indeed the $\delta^{13}\text{C}$ value measured in a sample does not only reflect the diet of the individual, but is also related to the lipid composition of the tissue sample, which is known to vary considerably among tissues, individuals and species. Two different methods have been proposed to account for lipid influence on $\delta^{13}\text{C}$ value: either chemical extraction prior to SIA or mathematical correction of the bulk tissue values. The former successfully removes lipids from tissue samples and gives lipid-free $\delta^{13}\text{C}$ values. However, some chemical extraction method can affect $\delta^{15}\text{N}$ by removing some

protein compounds linked to lipids (e.g., lipoproteins or transmembrane proteins). Two separate analyses for carbon and nitrogen stable isotopes is then required (Murry et al., 2006; Sotiropoulos et al., 2004; Ingram et al., 2007; Pinnegar and Polunin, 1999), while some methods allow for simultaneous carbon and nitrogen SIA by using specific solvent mixtures; but they remain expensive and time consuming (Schlechtriem et al., 2003; Logan and Lutcavage, 2008; Bodin et al., 2009). The latter consists in mathematical models that predict lipid-corrected isotope values using SIA of bulk tissue and different covariates including a proxy of lipid content. Two main types of mathematical corrections are currently available in the literature to predict the lipid-corrected isotopic values of carbon (Table 5.1): (i) statistical models using empirical relationships (linear or not) between bulk and lipid-free signatures; and (ii) the "mass balance" approach assuming that tissue are composed of lipid and protein only. There is no consensus for applying one particular type of correction model as evidenced by the large number of published studies addressing the question. Usually the most consistent models require species- or species-tissue-specific parameters.

In this paper, we dealt with the bias associated with variable lipid content in several tissues of three tuna species: bigeye tuna (*Thunnus obesus*; BET), skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*; SKJ) and yellowfin tuna (*T. albacares*; YFT). These large predatory fishes are widely exploited by industrial fisheries and their ecological role in trophic functioning of open ocean ecosystems still needs to be improved. During the last decade, several authors have applied SIA on the white muscle of tuna to investigate their trophic ecology (Kojadinovic et al., 2008; Graham et al., 2006; Ménard et al., 2007a; Revill et al., 2009; ?). However, due to the high mobility of these large pelagic species and their opportunistic behavior (i.e., non-selective predation constrained by local prey availability and predator-prey size ratios, Ménard et al., 2006), interpretation of isotopic data is not obvious. In parallel, multi-tissue analyses were developed in trophic studies of bluefin and yellowfin tuna to refine results about diet shifts (Madigan et al., 2012; Graham et al., 2006) but the issue of the influence of lipids on the tissue-specific isotopic signature has not been investigated in tropical tuna yet.

The central objective of this study was to deal with the highly variable lipid content in tuna tissues that impacts carbon isotopic values and interpretation, and then to assess the reliability of lipid removal using chemical extraction versus mathematical corrections that predict lipid-corrected $\delta^{13}\text{C}$ values. We therefore measured isotopic values of bulk and lipid-free white muscle, red muscle, liver and gonad tissues of SKJ, YFT and BET tuna caught in the Western Indian Ocean. We applied three types of mathematical corrections to the bulk measurements, with parameters either estimated from our data or selected in related studies, and assessed the predictive ability of the correction models with the lipid-free measurements. Then we discussed the relevance of mathematical normalization versus lipid removal. Finally, bulk and lipid-free isotopic signatures were discussed in terms of tissue-specific biochemical composition.

5.3 Material and method

5.3.1 Fish and tissue collection

A multi-species sampling was carried out from June 2012 to January 2014 during the unloading of the purse seiners at Victoria port (Seychelles) and was based on a 2-step methodology: (i) the ship wells were selected from among those containing fish from one set only, to obtain the exact fishing date and position, and (ii) fish from the three species of interest were chosen to sample the size range of purse-seine catches and to collect different life stages (i.e., immature and mature fish). A total of 39 BET, 42 SKJ and 48 YFT were collected throughout the Western Indian Ocean, and processed at the laboratory. First, the total fish weight (WT,

CHAPITRE 5. MÉTHODES DE NORMALISATION DES LIPIDES POUR L'ANALYSE ISOTOPIQUE DES TISSUS DE THON

Table 5.1: Non-exhaustive inventory of lipid-correction models from the literature and developed for marine organisms. Many studies compared different models using their data and are cited in the corresponding model type.

Model type	Equation	Taxon	Tissue	N	Bulk C:N (min-max)	Ref.
Non-linear	$\delta^{13}C_{corr} = \delta^{13}C_{bulk} + D \times \left(\frac{3.9}{1 + 287/L} \right)$ with $L =$ lipid content measured or calculated as $L = \frac{98}{1 + (0.246 \times C:N_{bulk} - 0.775)^2}$	Bering sea organisms (plankton to mammals) 14 fishes / 5 invertebrates Zooplankton spp. 2 seabirds 2 antarctic fishes 16 fishes / 10 invertebrates 2 cormorants 2 seabirds Zooplankton spp. Spiny dogfish 3 whales	Various Muscle / Whole Whole Muscle / Liver / Feathers Muscle Muscle / Liver / Gonad / Whole Muscle / Liver Eggs Whole Muscle / Liver Skin / Blubber	75 227 120 94 20 431 137 40 103 40 120	3.2-9.2 2.9-9.4 4.8-17.8 3.2-7.1 3.6-7.1 2.5-12.5 4.4-5.5 13.2-17.1 3.8-19.3 3.4-20 4.5-22.2	McConaughy & McRoy (1979) Kijunien et al (2006) Smyntek et al (2007) Kojadinovic et al (2008) Mintenbeck et al (2008) Logan et al (2008) Doucette et al (2010) Oppel et al (2010) Sväranta and Rautio (2010) Reum (2011) Ryan et al (2012)
	$\delta^{13}C_{corr} = \delta^{13}C_{bulk} + \frac{D \times C:N_{bulk} + a}{C:N_{bulk} + b}$ with $D =$ protein-lipid discrimination $I =$ constant adjusted to dataset	16 fishes / 10 invertebrates 30 deepfishes Mammals / birds 3 whales	Muscle / Liver / Gonad / Whole Muscle Muscle / Eggs Skin / Blubber	431 87 229 120	2.5-12.5 4.1-8.5 3-20.2 4.5-22.2	Logan et al (2008) Hoffman & Sutton (2010) Ehrich et al (2011) Ryan et al (2012)
	$\delta^{13}C_{corr} = \delta^{13}C_{bulk} + a \times C:N_{bulk} + b$ with a & $b =$ parameters adjusted to dataset	Zooplankton 16 aquatic animals Spider crab 2 seabirds 2 antarctic fishes 2 cormorants Zooplankton spp. 3 whales Dolphin	Whole Muscle Muscle / Gonad / Hepatopancreas Muscle / Liver / Feathers Muscle Muscle / Liver Whole Skin / Blubber Skin	— 28 46 94 20 137 103 120 35	3.2-10 3.0-6.9 2.7-5.1 3.2-7.1 3.6-7.1 4.4-5.5 3.8-19.3 4.5-22.2 3.1-4.5	Leggett (1998) Post et al (2007) Bodin et al (2007) Kojadinovic et al (2008) Mintenbeck et al (2008) Doucette et al (2010) Sväranta and Rautio (2010) Ryan et al (2012) Wilson et al (2014)
	$\delta^{13}C_{corr} = \delta^{13}C_{bulk} + \beta_0 + \beta_1 \times \ln(C:N_{bulk})$ with β_0 & $\beta_1 =$ parameters adjusted to dataset	16 fishes / 10 invertebrates Zooplankton spp. Mammals / birds Spiny dogfish 3 whales 8 aquatic birds	Muscle / Liver / Gonad / Whole Whole Muscle / Eggs Muscle / Liver Skin / Blubber Eggs	431 103 229 40 120 175	2.5-12.5 3.8-19.3 3-20.2 3.4-20 4.5-22.2 4-17	Logan et al (2008) Sväranta and Rautio (2010) Ehrich et al (2011) Reum (2011) Ryan et al (2012) Elliott et al (2014)
Log-linear	$\delta^{13}C_{corr} = \delta^{13}C_{bulk} + D \times \frac{D \times C:N_{bulk} + a}{C:N_{bulk}}$ with $D =$ protein-lipid discrimination	7 freshwater fishes 16 fishes / 10 invertebrates Mammals / birds Spiny dogfish 3 whales	Muscle Muscle / Liver / Gonad / Whole Muscle / Eggs Muscle / Liver Skin / Blubber	116 431 229 40 120	3.2-8.2 2.5-12.5 3-20.2 3.4-20 4.5-22.2	Fry (2002) Logan et al (2008) Ehrich et al (2011) Reum (2011) Ryan et al (2012)
	$\delta^{13}C_{corr} = \frac{\delta^{13}C_{bulk} \times C:N_{bulk} - D \times (C:N_{bulk} - C:N_{pre-protein})}{C:N_{pre-protein}}$ with $D =$ protein-lipid discrimination	Shrimp Seabass Zooplankton spp. 2 antarctic fishes 2 cormorants 30 deep fishes Zooplankton spp. Dolphin	Hepatopancreas Muscle / Liver Whole Muscle / Liver Muscle Muscle Whole Skin	138 1256 120 20 87 103 35	— 4-19 4.8-17.8 3.63-7.14 4.4-5.5 4.1-8.5 3.8-19.3 3.1-4.5	Fry et al (2003) Sweeting et al (2008) Smyntek et al (2007) Mintenbeck et al (2008) Doucette et al (2010) Hoffman & Sutton (2010) Sväranta and Rautio (2010) Wilson et al (2014)
Mass balance	$\delta^{13}C_{corr} = \frac{\delta^{13}C_{bulk} \times C:N_{bulk} - D \times (C:N_{bulk} - C:N_{pre-protein})}{C:N_{pre-protein}}$ with $D =$ protein-lipid discrimination					

kg), the fork length (FL, cm), which refers to the length from the tip of the snout to the fork of the tail, and the sex were recorded for each individual. The weights of gonads and viscera (including stomach, liver, intestine, pyloric caecum, kidney, heart and spleen) were also determined and allowed for the estimation of the fish somatic weight (WS: total fish weight minus viscera and gonad weights) and the gonadosomatic index (GSI: ratio between the gonad and somatic weights). Then, two samples of around 2g on a wet weight (ww) basis were taken from the dorsal white muscle (W; under the dorsal spine on the left side), red muscle (R; under the pectoral tail on the left side), liver (L) of each fish, as well as from gonads (G) for mature ones. All samples were stored at -80°C until further analyses.

5.3.2 Carbon and nitrogen stable isotope analysis

A total of 468 samples (129 L, 128 R, 129 W and 82 G) were freeze-dried to preserve the integrity of the tissues (Bessey and Vanderklift, 2014). Each dried sample was then ground up to a fine homogeneous powder with a mixer mill MM200 (Retsch, Eragny sur Oise, France), and split into two sub-samples: the first one was kept bulk in a dry room until encapsulation, while the second one was treated for lipid extraction.

Lipid extraction method

Lipids were extracted according to the method of Bodin et al. (2009). Briefly, approximately 350±100mg of each powdered and dried sample was weighed and extracted with 8mL of dichloromethane (CH_2Cl_2) at 100°C under 1900 psi for 10 minutes using a Dionex ASE 200 Accelerated Solvent Extractor (Voisins De Bretonneux, France). The lipid-free samples were dried under an extractor fan and stored in a dry room until encapsulation. The extracts were evaporated to dryness using a N-Evap 111 extractor (OA-SYS, Berlin, USA) at a bath temperature of 35°C and residues were weighed on an Adventurer Pro (OHAUS, Nänikon, Swiss) analytical balance to the nearest 0.1mg to determine the total lipid content of the samples expressed in % of dry weight (dw).

Isotope Ratio Mass Spectrometry

Approximately 0.4±0.1mg of each dried sample was weighed on a XP6 Metler Toledo microbalance (Viroflay, France) to the nearest µg and packed into a 8*5mm² pressed tin capsules (Sylab, Metz, France) for simultaneous C and N SIA. Samples were analyzed using an Elemental Analyser (Flash EA 1112, Thermo Scientific, Milan, Italy) coupled to an Isotope Ratio Mass Spectrometer (Delta V Advantage with a ConFlo IV interface, Thermo Scientific, Bremen, Germany) (EA-IRMS) at the LIENSs stable isotope facility (La Rochelle, France). Results were reported in the δ unit notation and expressed as per mil (‰) relatively to international standards (Vienna-Pee Dee Belemnite for carbon and atmospheric N₂ for nitrogen). Calibration was done using reference materials (USGS-24, IAEA-CHE, -600 for carbon; IAEA-N₂, -NO₃⁻, -600 for nitrogen). Analytical precision based on replicate measurements of internal laboratory standard (acetanilide, Thermo Scientific) was < 0.15‰ for both δ¹⁵N and δ¹³C. C:N ratios were determined from % element weight. The extent of chemical extraction for lipid-free sub-samples was checked through the C:N ratio: 38 L and two G samples showed C:N ratios > 4 and were considered still fatty (McConnaughey and McRoy, 1979). These 40 samples were submitted to a second ASE extraction and EA-IRMS analysis as described above to prevent for any possible leftover lipids. The final C:N ratios, δ¹³C and δ¹⁵N values obtained were considered as lipid-free results. The total lipid content of these 40 samples corresponds to the sum of the masses of the two extracted materials.

5.3.3 Lipid class and protein analyses

A total of 219 samples (61 L, 63 R, 62 W and 33 G) were submitted to additional analyses to determine the tissue biochemical composition of the three tuna species. Approximately 250 ± 50 mg of each wet sample were weighed on an analytical balance to the nearest mg, then crushed using a FastPrep System[®] (MP Biomedicals, Illkirch, France) and extracted with 2 mL of dichloromethane:methanol (2:1, v/v) (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). After centrifugation the lower layer was collected, evaporated and finally re-suspended in a known volume of dichloromethane. An aliquot of the extract was spotted on chromarods SIII (rods of quartz covered with silica), and separated into lipid classes and quantified using an Iatroscan MK-6s (Mitsubishi Chemical Medience, Tokyo, Japan) thin-layer chromatography-flame ionization detector analyzer (TLC-FID) (Parrish, 1999). Concentrations of triacylglycerols (TAG) and phospholipids (PL), the two main lipid classes in tropical tuna representative of reserve and structure lipids respectively (Bodin et al., 2014), were expressed in % wet weight (ww) using suitable calibration curves. The total protein content was determined using bicinchoninic acid protein assay kit (BCA, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Approximately 15 ± 5 mg of each wet sample were weighed to the nearest mg, incubated with BCA after grinding in mixer mill MM400 (Retsch, Eragny sur Oise, France) and submitted to successive heat shocks (i.e., two passages of 30 seconds in liquid nitrogen and 5 minutes in ultrasonic baths at 30°C performed alternately). Absorbance at 520 nm was determined using Infinite 200 spectrophotometer (TECAN, Lyon, France) and converted in protein concentration using Bovine Serum Albumine (BSA) as reference. Total protein contents were expressed in % ww.

5.3.4 Statistical analyses and models

Non parametric statistics (Wilcoxon's rank test and Spearman's rank correlation) were applied to our dataset.

General effects of lipid extraction on SIA

The effect of lipid extraction on $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values was tested using paired Wilcoxon's tests (with V the Wilcoxon's statistic). The potential effect of explanatory variables (tissue, species, sex or lipid content) on differences between bulk and lipid-free $\delta^{13}\text{C}$ and then $\delta^{15}\text{N}$ values was assessed using linear regressions and Box-Cox transformations for variance stabilization. Indeed our sample size was large enough to consider that non-normality of residuals should not adversely affect the inferential procedures. Mean values were expressed \pm SD. The coefficient of variation (CV in %) was used for comparing range of variation. Hereafter the notations are: $\Delta\delta^{15}\text{N} = \delta^{15}\text{N}_{\text{lipid-free}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$ and $\Delta\delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_{\text{lipid-free}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}}$.

Lipid-normalization modeling

Equations of lipid normalization models used the C:N_{bulk} , lipid content and $\delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}}$ to predict a lipid-corrected $\delta^{13}\text{C}$ value ($\delta^{13}\text{C}_{\text{corr}}$). Our data confirmed that bulk C:N ratio (C:N_{bulk}) was a reliable proxy of lipid content (for all tissues, Figure 5.1). Here we tested three models that include all types of lipid normalization models (Table 5.1): the non-linear model of McConnaughey and McRoy (1979) [eq1], the linear model of Post et al. (2007) [eq2], and the mass balance equation of Fry (2002) [eq3]:

$$\text{[eq1]} \quad \delta^{13}\text{C}_{\text{corr}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}} + D \times \left(I + \frac{3.9}{1 + 287/L} \right)$$

$$\text{[eq2]} \quad \delta^{13}\text{C}_{\text{corr}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}} + a \times \text{C:N}_{\text{bulk}} + b$$

$$[\text{eq3}] \delta^{13}C_{\text{corr}} = \delta^{13}C_{\text{bulk}} + D - \left(\frac{D \times C : N_{\text{pure protein}}}{C : N_{\text{bulk}}} \right)$$

Parameters are defined in Table 5.1. Models were first implemented using parameters based on our dataset. In [eq1] L was the lipid content obtained from the ASE extraction of each sample, and in [eq3] the mean C:N_{lipid-free} for each tuna tissue was used as the C:N of pure proteins. Parameters a and b in [eq2], the lipid-protein discrimination D in [eq1] and [eq2] were estimated from our dataset and for each tissue using least-squares estimation. Then models were implemented using parameters based on published studies. In [eq1] and [eq3] we used a value of 7.49‰ for D in muscles and 8‰ for liver and gonads based Logan et al. (2008) investigations on bluefin tuna. I was fixed to -0.207 in [eq1] as in McConnaughey and McRoy (1979) and we adopted for a and b in [eq2] the value proposed by Post et al. (2007) for aquatic animals (0.99 and -3.32, respectively). To assess predictive performances, we trained each model with a random subset of the data (i.e., 2/3 of the data in each tissue). A cross validation was performed using the parameters estimated from the training data, in order to predict the unused data (validation dataset). Besides we predicted six sets of lipid-corrected $\delta^{13}C$ data using models [eq1], [eq2] and [eq3] in both parameters' configuration. To assess the quality of each model, predicted values were compared to the observed data from the validation dataset, and differences were tested using paired Wilcoxon's test. Differences between the lipid-corrected and observed lipid-free $\delta^{13}C$ values are noted as $\Delta\delta^{13}C_{\text{error}}$ with $\Delta\delta^{13}C_{\text{error}} = \delta^{13}C_{\text{corr}} - \delta^{13}C_{\text{lipid-free}}$. The process of cross-validation on random subsets was repeated 500 times. Thereby paired Wilcoxon's tests were carried out for each model and at each trial, and means, maxima and distributions of $\Delta\delta^{13}C_{\text{error}}$ were computed or plotted to detect any mismatch.

Lipid class composition and total protein content

The effects of tissue and sex on lipid class concentrations and total protein content were tested for each tuna species using Wilcoxon's test. Ranges of variation were compared using CV. Statistical analyses were performed using R 3.0.2 software (2015). Function *nls* of library MASS was used for nonlinear least-squares estimates.

5.4 Results

Morphological characteristics (FL and WT) of the sampled tuna as well as their tissue isotopic composition and total lipid content are presented in Table 5.2.

5.4.1 Bulk tissue characteristics

Lipid and protein composition

The total lipid and protein contents varied among tissues and species. Liver was on average the fattest and white muscle the leanest somatic tissue for all species, and lipid content was similar in red muscle and in gonads ($V=5600$, $p=0.41$). SKJ showed the lowest lipid variation in liver (CV = 36.3%, min-max = 8.1-30.4% dw) and in white muscle (25.4%, 1.08-3.6% dw). For YFT, CV was 57.0% in liver (2.7-43.3% dw) and 45.8% in white muscle (0.3-5.7% dw). For BET, CV was 49% in liver (6.6-40.0% dw) and 65% in white muscle (1.2-8.8% dw). Red muscle showed the largest lipid variation in BET (45.2%, 3.1-26.2% dw) compared to YFT (30.4%, 5.5-19.3% dw) and SKJ (29.6%, 4.4-18.1% dw). Gonads of SKJ had a smaller range of variation in lipid content (21.2%) compared to BET (63.4%) and YFT (60.6%). In addition, GSI of mature tuna was

CHAPITRE 5. MÉTHODES DE NORMALISATION DES LIPIDES POUR L'ANALYSE ISOTOPIQUE DES TISSUS DE THON

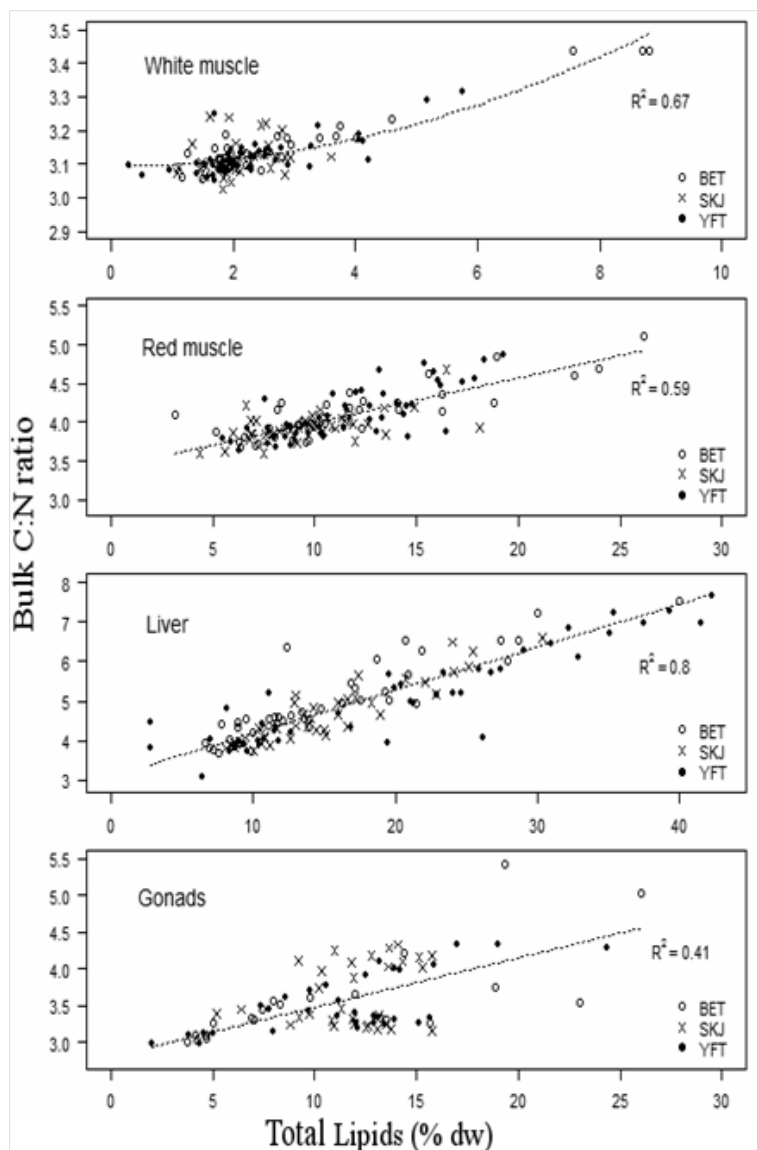


Fig. 5.1: Relationship between bulk C:N ratio and total lipid content (% dw) for each tissue of yellowfin (YFT), skipjack (SKJ) and bigeye (BET). A curvilinear model was significant in white muscle only. Coefficients of determination (R^2) are given.

Table 5.2: Mean values (\pm standard deviation) of total lipid content (% dw), isotopic data ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) and C:N ratios for bulk and lipid-free samples in the gonads (G), liver (L), red muscle (R) and white muscle (W) of tropical tuna (YFT=yellowfin; BET=bigeye; SKJ=skipjack) sampled in the Western Indian Ocean.

Species	F_L (cm)	W_T (kg)	Tissue	n	Lipid content (%) dw	BULK			LIPID-FREE		
						$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	C:N	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	C:N
BET	36.2-160.8	1.3-96.4	W	39	2.8 \pm 1.8	-17.3 \pm 0.4	12.5 \pm 0.8	3.16 \pm 0.09	-17.1 \pm 0.3	12.7 \pm 0.8	3.09 \pm 0.04
			R	39	11.4 \pm 5.2	-18.7 \pm 0.5	13.3 \pm 0.8	4.10 \pm 0.33	-17.8 \pm 0.4	13.4 \pm 0.8	3.53 \pm 0.13
			L	39	15.5 \pm 7.6	-19.0 \pm 0.7	11.4 \pm 0.8	5.00 \pm 1.00	-17.5 \pm 0.4	11.5 \pm 0.8	3.92 \pm 0.41
			G	21	10.4 \pm 6.6	-17.8 \pm 1.0	11.1 \pm 0.6	3.52 \pm 0.61	-16.8 \pm 0.5	11.2 \pm 0.6	3.05 \pm 0.31
SKJ	30.0-78.5	0.5-8.5	W	42	2.1 \pm 0.5	-17.1 \pm 0.3	11.1 \pm 0.9	3.11 \pm 0.05	-17.0 \pm 0.3	11.1 \pm 0.8	3.06 \pm 0.04
			R	41	9.9 \pm 2.9	-18.5 \pm 0.5	12.3 \pm 0.9	3.96 \pm 0.19	-17.7 \pm 0.4	12.3 \pm 0.9	3.51 \pm 0.14
			L	42	15.1 \pm 5.5	-18.9 \pm 0.6	10.4 \pm 1.0	4.68 \pm 0.76	-17.6 \pm 0.4	10.5 \pm 1.0	3.74 \pm 0.37
			G	31	11.9 \pm 2.5	-18.4 \pm 0.6	10.4 \pm 1.1	3.65 \pm 0.43	-17.1 \pm 0.6	10.5 \pm 1.1	3.03 \pm 0.31
YFT	29.0-156.5	0.6-80.3	W	48	2.3 \pm 1.1	-16.9 \pm 0.4	11.7 \pm 1.0	3.15 \pm 0.16	-16.8 \pm 0.4	11.9 \pm 0.9	3.06 \pm 0.03
			R	48	11.7 \pm 3.5	-18.4 \pm 0.5	12.8 \pm 1.0	4.11 \pm 0.33	-17.5 \pm 0.4	12.9 \pm 1.0	3.53 \pm 0.13
			L	48	19.6 \pm 11.2	-19.1 \pm 1.1	10.9 \pm 0.9	5.10 \pm 1.31	-17.3 \pm 0.5	11.0 \pm 1.0	3.68 \pm 0.28
			G	30	12.5 \pm 7.6	-18.0 \pm 1.1	10.7 \pm 0.7	3.67 \pm 0.95	-16.6 \pm 0.6	10.8 \pm 0.7	2.98 \pm 0.23

correlated with the lipid content of gonads only (Spearman's statistic $S=56408$, $p<0.001$; liver: $S=117758$, $p=0.15$; red muscle: $S=150494$, $p=0.24$; white muscle: $S=144226$, $p=0.69$). For all species, liver had higher protein levels than white muscle ($V=2813$, $p<0.01$) and red muscle ($V=5289$, $p<0.001$). Finally, very few reserve lipids (TAG) were recovered in white muscle of the three species (Figure 5.2), while red muscle and liver, which had higher contents than white muscle (liver: $V=3646.5$, $p<0.001$ and red muscle: $V=4020$, $p<0.001$), did not differ significantly ($V=2403$, $p=0.76$). Structural lipids (PL) were higher in red muscle than in liver ($V=3259$, $p<0.01$), and higher in liver than in white muscle ($V=3668$, $p<0.001$). TAG and proteins contents in gonad of the three species were higher in female than in male ($V=236$, $p<0.01$ and $V=319$, $p<0.01$, respectively) but differences were not significant for PL ($V=135$, $p=0.77$).

$\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$ values and C:N ratios

Bulk $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values varied between tissue and species. Mean bulk $\delta^{15}\text{N}$ values ranked $\text{BET} > \text{YFT} > \text{SKJ}$ in all tissues. Liver (9.0%), white muscle (8.9%), gonads (8.5%) and red muscle (7.8%) had very close CV of bulk $\delta^{15}\text{N}$ values, and, overall, YFT exhibited the greatest CV and BET the lowest. White and red muscles had low CV of bulk $\delta^{13}\text{C}$ values (2.4 and 2.7%, respectively), while liver and gonads showed higher but similar CV (4.5 and 4.7%, respectively). Finally, bulk C:N ratios varied according to lipid content variation: 21.6% in liver, 13.4% in gonads, 7.4% in red muscle and only 2.2% in the leanest tissue, the white muscle. Interestingly, bulk C:N ratios significantly differed between male and female in SKJ gonads only ($V=236$, $p<0.001$), with higher values in females (mean C:N > 4).

5.4.2 Influence of lipid extraction on tissue isotopic composition

Effect of ASE extraction method

Most of the samples showed a C:N ratio < 4 after a first lipid extraction, except for 40 tissues characterized by higher total lipid contents (18.5 ± 7.7 % dw). A second extraction was then processed, which removed on average 2% dw more of lipids (between 0.5 and 10%). The repeated extraction did not significantly affect $\delta^{15}\text{N}$ values ($V=481$, $p=0.21$), but it slightly increased $\delta^{13}\text{C}$ values (0.1‰ in mean, $V=585$, $p<0.05$) and surprisingly the C:N ratio (0.08 in mean, $V=67$, $p<0.001$) (Table 5.3). Despite the two chemical extractions performed successively, 19 samples were still characterized by C:N ratio > 4.

Table 5.3: Results of the two chemical extractions performed successively on 40 samples: mean values (\pm standard deviation) of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values, and C:N ratio of bulk samples and after chemical extractions. Letters indicate significant differences ($p < 0.05$) based on Wilcoxon's test: a = different from bulk, b = different from first extraction.

	Bulk	1st lipid-extraction	2nd lipid-extraction
Total lipids (% dw)	n/a	18.6	2.1
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	-19.3 ± 0.8	-17.4 ± 0.5^a	-17.4 ± 0.4^{ab}
$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	11.2 ± 0.7	11.3 ± 0.6	11.3 ± 0.7^a
C:N	4.09 ± 0.92	4.25 ± 0.30^a	5.74 ± 0.32^{ab}

$\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ changes after lipid extraction

A tiny but significant increase of $\delta^{15}\text{N}$ was observed after lipid extraction ($\Delta\delta^{15}\text{N} = 0.1 \pm 0.2$ ‰; $V=85992$, $p<0.001$). A tissue effect was detected at the 5% significance level by the regression linear applied to $\Delta\delta^{15}\text{N}$ values (Table 5.4). Obviously $\delta^{13}\text{C}$ values increased strongly after lipid extraction ($V=108567$, $p<0.001$).

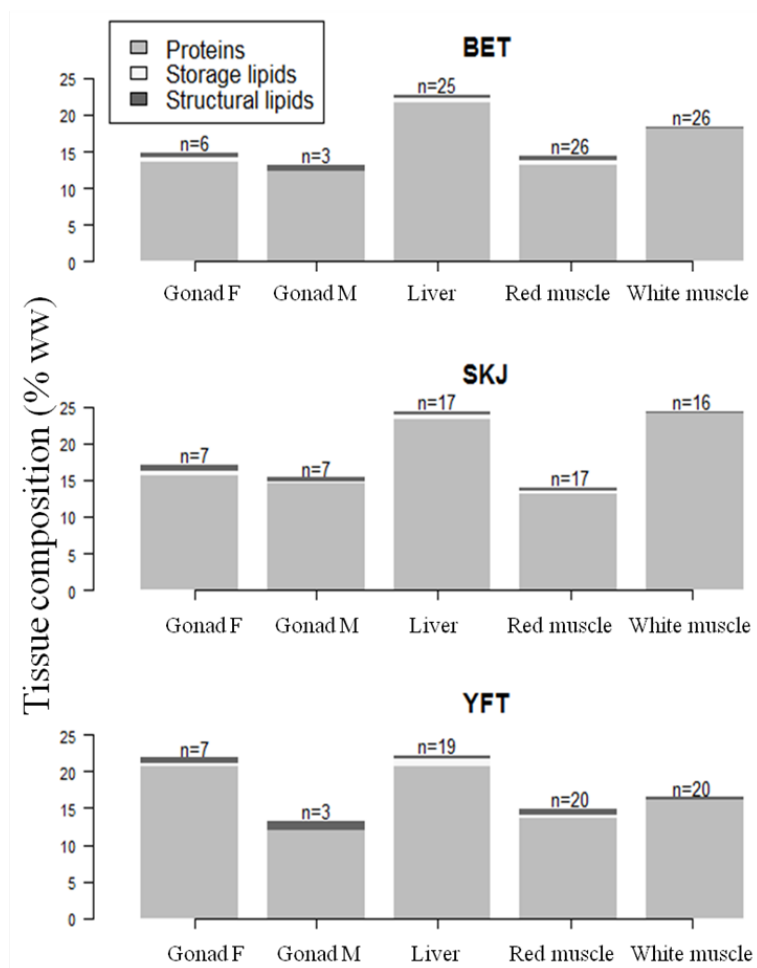


Fig. 5.2: Lipid and protein composition (in % ww) of the white muscle, red muscle, liver and gonads of the three tropical tuna species. Reserve lipids refer to TriAcylGlycerol (TAG) and structural lipids to Phospholipids (PL). Gonad F=female gonads; Gonad M=male gonads; YFT=yellowfin; BET=bigeye; SKJ=skipjack.

Linear regression results showed that lipid content, tissue and sex affected $\Delta\delta^{13}\text{C}$ values (Table 5.4). The highest change in $\delta^{13}\text{C}$ value was observed in liver ($\Delta\delta^{13}\text{C} = 1.6 \pm 0.4\text{‰}$) and the lowest in white muscle ($\Delta\delta^{13}\text{C} = 0.1 \pm 0.1\text{‰}$). The variability of the $\delta^{13}\text{C}$ values was clearly reduced in all tissues after the lipid extraction: CV decreased from 4.8 to 3.6% in gonads, from 4.5 to 2.5% in liver and from 2.7 and 2.4% to 2.3 and 2.1% in red and white muscles, respectively. Gonads were the only tissue with differences between male and female: C:N_{lipid-free} ratios measured in gonads were positively correlated to GSI in females for the three species (BET: V=144, p<0.001; SKJ: V=186, p<0.01 and YFT: V=121, p<0.001) and negatively in males (BET: V=81, p<0.001; SKJ: V=188, p<0.05 and YFT: V=361, p<0.001) (Figure 5.3). Finally C:N_{lipid-free} ratios were less variable in muscles (CV=1.3 and 3.7% in white and red muscles, respectively) than in liver and gonads (9.6 and 9.2%, respectively).

5.4.3 Lipid correction models for $\delta^{13}\text{C}$ values

As tissue impacted lipid content and bulk C:N ratios, models were fitted for each tissue. Indeed our results did not justify species- or sex-specific models. We then assessed the predictive performance of the three models in the two parameters' configuration: based on our dataset and based on published studies. Table 5.5 presents the estimated values of parameters for each tissue and from our dataset, and Table 5.6 displays the results of the cross validation procedure that was repeated 500 times. Results of the paired Wilcoxon's tests

Table 5.4: Diagnostic statistics of the linear regression models with $\Delta\delta^{15}\text{N}$ and $\Delta\delta^{13}\text{C}$ as dependant variables, and lipid content, tissue, species and sex as explanatory variables. $\Delta\delta^{15}\text{N} = \delta^{15}\text{N}_{\text{lipid-free}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$ and $\Delta\delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_{\text{lipid-free}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}}$, i.e. the differences between the isotopic values of bulk and lipid-free samples.

	df	$\Delta\delta^{15}\text{N}$			$\Delta\delta^{13}\text{C}$		
		Mean Squares	F value	Pr(>F)	Mean Squares	F value	Pr(>F)
Lipid content	1	0.009203	2.69	NS	12.036	3170.06	p<0.001
Tissue	3	0.012988	3.79	p<0.05	0.184	48.39	p<0.001
Species	2	0.008234	2.41	NS	0.008	2.09	NS
Sex	2	0.00244	0.71	NS	0.027	7.15	p<0.01
Residuals	462	0.003423			0.004		

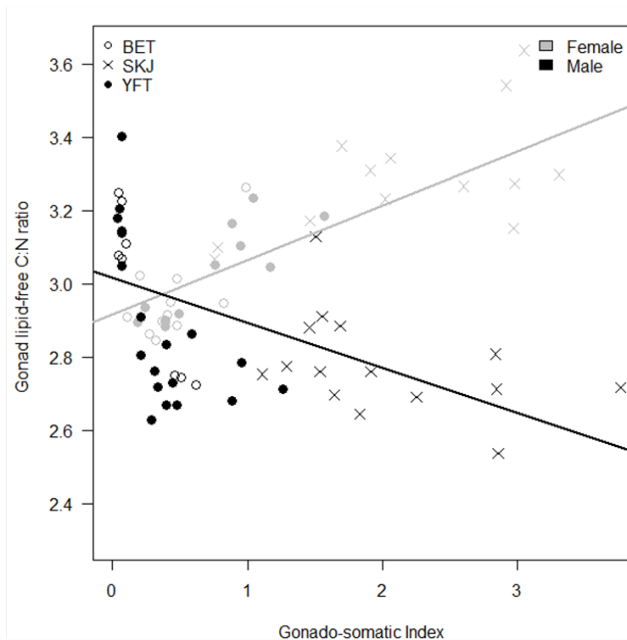


Fig. 5.3: Linear regression models between the Gonado-Somatic Index (GSI) and the lipid-free C:N ratio measured in gonads of males and females of the three tropical tuna species (YFT=yellowfin; SKJ=skipjack; BET=bigeye).

between predicted and observed values were expressed in % of acceptable p-values (i.e., % of $p > 0.05$) among the 500 iterations. The three models [eq1], [eq2] and [eq3] using parameters based on published studies gave very bad predictions with systematic discrepancies with $\delta^{13}\text{C}_{\text{lipid-free}}$. Figure 5.4 displays the distribution of $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{error}}$ values computed from the three models using parameters from our dataset. For white muscle, the three models provided reliable predictions and were suitable for correcting bulk $\delta^{13}\text{C}$ values. Again [eq1] and [eq2] gave accurate predictions for the three other tissues even if maximum differences between $\delta^{13}\text{C}_{\text{corr}}$ and $\delta^{13}\text{C}_{\text{lipid-free}}$ could occasionally be much greater than 1‰. However [eq3] did not provide the same level of good predictions compared to the other models: systematic mismatch was observed in the distribution of the $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{error}}$ values showing an underestimation of predicted values (Figure 5.4).

CHAPITRE 5. MÉTHODES DE NORMALISATION DES LIPIDES POUR L'ANALYSE ISOTOPIQUE DES TISSUS DE THON

Table 5.5: Estimated parameter values (\pm SD) from our dataset of the three correction models that predict lipid-corrected $\delta^{13}\text{C}$ values in white (W) and red (R) muscles, liver (L) and gonads (G) of tropical tuna (see text).

	McConnaughey & McRoy ^[25] [eq1]		Post et al. ^[32] [eq2]		Fry ^[27] [eq3]
Tissue	<i>D</i>	<i>I</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>D</i>
W	6.4 \pm 0.9	-0.012 \pm 0.004	1.97 \pm 0.13	-6.05 \pm 0.42	6.6 \pm 0.38
R	6.2 \pm 0.4	0.001 \pm 0.009	1.01 \pm 0.07	-3.22 \pm 0.26	6.6 \pm 0.09
L	8.1 \pm 0.3	-0.018 \pm 0.007	0.76 \pm 0.02	-2.18 \pm 0.12	6.9 \pm 0.1
G	7.4 \pm 0.4	0.028 \pm 0.008	0.59 \pm 0.08	-0.817 \pm 0.29	6.8 \pm 0.16

Table 5.6: Assessment of the prediction of the three models [eq1], [eq2], [eq3] using a cross validation procedure that was repeated 500 times, and in the two parameters' configuration: based on our dataset (Table 4) and based on published studies (see text). Paired Wilcoxon's tests were carried out for each model and at each trial to compare predicted ($\delta^{13}\text{C}_{\text{corr}}$) and observed ($\delta^{13}\text{C}_{\text{lipid-free}}$) values. Good predictions are expressed in % of acceptable p-values (i.e., % of p-values > 0.05) for the 500 iterations. Mean and maximum values of $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{error}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{corrected}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{lipid-free}}$ are specified.

		Adjusted parameters				Literature parameters			
		W	R	L	G	W	R	L	G
McConnaughey & McRoy ^[25] [eq1]	Good predictions (%)	88	89	86	89	0	0	0	0
	Mean $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{error}}$ (‰)	-0.001 \pm 0.035	-0.001 \pm 0.046	-0.001 \pm 0.068	0.004 \pm 0.055	0.3 \pm 0.03	-1.3 \pm 0.03	-1.6 \pm 0.05	-1.7 \pm 0.04
	Max $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{error}}$ (‰)	0.6	0.9	1.6	1	1.9	2	2.8	2.2
Post et al. ^[32] [eq2]	Good predictions (%)	88	91	90	89	0	0	92	0
	Mean $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{error}}$ (‰)	-0.002 \pm 0.029	0.0 \pm 0.045	-0.005 \pm 0.076	0.004 \pm 0.091	-0.4 \pm 0.02	-0.2 \pm 0.03	0.0 \pm 0.06	-1.1 \pm 0.07
	Max $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{error}}$ (‰)	0.5	1.2	1.3	1	0.8	1	1.5	1.9
Fry ^[27] [eq3]	Good predictions (%)	87	54	16.9	10.2	0	0	0	0
	Mean $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{error}}$ (‰)	-0.002 \pm 0.028	-0.047 \pm 0.029	-0.184 \pm 0.04	-0.278 \pm 0.036	-0.1 \pm 0.03	-0.9 \pm 0.05	-1.9 \pm 0.16	-1.4 \pm 0.09
	Max $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{error}}$ (‰)	0.5	1.2	1.4	1.6	0.67	1.8	5.2	3.2

5.5 Discussion

Lipids greatly influenced the carbon isotopic composition of soft tissues of tropical tuna as evidenced by the significant increase in $\delta^{13}\text{C}$ after lipid extraction, especially in fat tissues such as liver, gonads and red muscle (Table 5.2). As lipid composition varies among tissues, species and individuals (related to life cycle, i.e. reproduction, sex, age, migration, starvation and/or to environmental factors), lipid normalization techniques are required for interpreting carbon isotopic composition. The lipid extraction method using dichloromethane only, as proposed by Bodin et al. (2009), had a negligible effect on $\delta^{15}\text{N}$ values (increase of 0.1‰ in mean) across tissues and tuna species (Table 5.2). This modification is under the IRMS precision (0.15‰) confirming that distinct analyses of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values are not required for tropical tuna tissues with this chemical extraction method. Moreover, the low total lipid content found in white muscle (less than 3% dw, Table 5.2) and its composition (proteins and polar lipids, Figure 5.2) revealed that lipid removal prior to SIA is not essential for this tissue. For the fattest tissues (i.e., liver and possibly gonads), however,

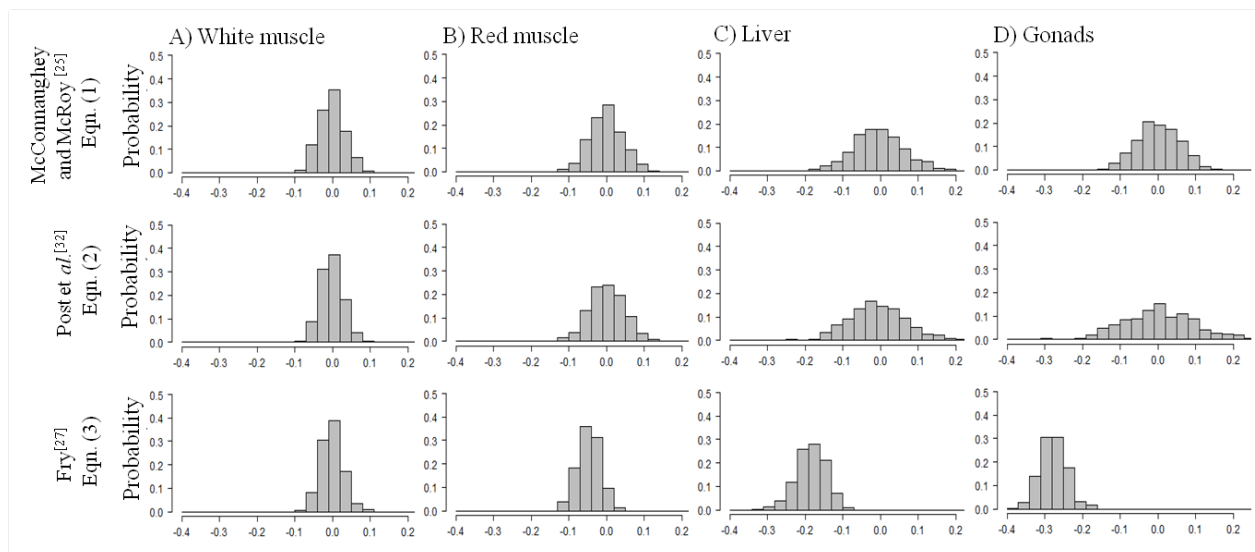


Fig. 5.4: Distributions of the $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{error}}$, i.e. the differences between the lipid-corrected and observed lipid-free $\delta^{13}\text{C}$ values in different tissues of tropical tuna. Lipid-corrected values were predicted from the three lipid-normalization models using a cross validation procedure that was repeated 500 times. $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{error}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{corrected}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{lipid-free}}$

a longer lipid extraction process or using more solvent than in the method of Bodin et al. (2009) might be necessary to properly remove most of lipid compounds. The liver of tropical tuna was characterized by an high C:N ratio ($\text{C:N} = 5.7 \pm 0.3$) even after two ASE extraction cycles. A similar result was previously observed in sea bass liver ($\text{C:N} = 5.6$; Sweeting et al., 2006) and could reflect the peculiar C:N signature of proteins in tuna liver. But this high ratio could also relate to highly polar lipids that were not totally extracted with the method of Bodin et al. (2009). Indeed, by using a medium polar solvent (dichloromethane with dipole moment of 1.14 D), this method removes neutral and medium polar lipid compounds but not the most polar ones (e.g. some phospholipids or lipoproteins) in order to avoid any unwanted effect on $\delta^{15}\text{N}$ value (Bodin et al., 2009). The additional biochemical analyses performed in the present study revealed the high quantity of proteins and phospholipids in the liver of tropical tuna (Figure 5.2), and therefore strengthened the second hypothesis that the observed high C:N ratio in the lipid extracted liver reflected the signature of proteins and remaining highly polar lipids.

5.5.1 Lipid correction models

To overcome a tedious, time-consuming, and costly chemical extraction process, we investigated different mathematical models that deal with lipid contents and predict lipid-corrected isotopic values using SIA of the bulk tissue and different covariates. We analyzed several tissues of three tropical tuna species and estimated specific parameters with our dataset. The confidence of the tissue-specific models was thoroughly assessed using a cross validation procedure that tested their predictive ability. Models using published parameters' estimates from other species systematically failed to predict lipid-corrected $\delta^{13}\text{C}$ values. Such approaches are definitively not suited for trophic studies using SIA. Linear and non-linear models (i.e., equations of Post et al. (2007) and McConnaughey and McRoy (1979), respectively) provided accurate $\delta^{13}\text{C}$ predictions when parameters were estimated for each tissue and from our dataset. The mass balance equation of Fry (2002) gave reliable predictions for white muscle only, which is the leanest tissue (i.e., lipid content $<10\%$ dw). But

CHAPITRE 5. MÉTHODES DE NORMALISATION DES LIPIDES POUR L'ANALYSE ISOTOPIQUE DES TISSUS DE THON

the mass balance equation led to systematic biased predictions for red muscle, liver and gonads: predicted values were underestimated and a larger mismatch was observed for gonads (mean $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{error}} = -0.28$) and liver (mean $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{error}} = -0.18$) than for red muscle (mean $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{error}} = -0.05$) (Figure 5.4). For red muscle, liver and gonads, discrepancies between lipid-free and corrected values of a given model could be great. The maximum $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{error}}$ ranged from 1.2‰ in red muscle with [eq2] and [eq3] to more than 1.6‰ in liver with [eq1], and 1.6‰ in gonads with [eq3]. Despite these discrepancies, [eq1] and [eq2] provided accurate predictions in all tissues and in about 90% of the time. Therefore they can be used for correcting bulk $\delta^{13}\text{C}$ values in trophic studies according to a close range of lipid content that we measured in our tuna tissues. But we do not recommend [eq3] that gave systematic biased predictions for red muscle, liver and gonads, despite errors within an acceptable range for ecological interpretations. We suspected that this result relied on the correct estimation of $\text{C:N}_{\text{lipid-free}}$ as previously observed (Sweeting et al., 2006). Indeed discrepancies between lipid-free and corrected values increased with the $\text{C:N}_{\text{lipid-free}}$ variability: 54% of good prediction for red muscles with a $\text{C:N}_{\text{lipid-free}}$ variability around 3.6%, which went down to 10-20% in gonads and liver with a $\text{C:N}_{\text{lipid-free}}$ variability close to 9%.

However all models did not required the same level of information. The equations of McConnaughey and McRoy (1979) (i.e. [eq1]) and the mass balance approach of Fry (2002) (i.e. [eq3]) required empirical information in addition to the estimation of parameters from a part of the dataset: the lipid content L , which was sample dependant for [eq1], and the C:N of pure proteins that varied among tissue and needed lipid-free samples for [eq3]. Moreover adjusted parameters were also tissue-specific. For instance D , which was estimated from our dataset, varied among tissue in [eq1] mainly and in [eq3] to a lesser extent, and between [eq1] and [eq3] (Table 5.5), suggesting that D is not constant but could vary according to tissue composition. The highest D values were estimated in liver for both [eq1] and [eq2], but no clear trend was observed between D estimates and the mean total lipid nor between D estimates and lipid classes (TAG and PL) of each tissue. Further biochemical analyzes involving for instance the dynamics of fatty acids (see below) are needed to understand the processes of lipid-protein discrimination. The estimation process might weaken here the basic assumptions of biochemical composition used in the mass balance approach. Finally [eq2] was easier to implement as this model did not require lipid content and thus we recommend its use for tropical tuna according to the range of lipid content we measured in the tissues under study. Therefore correction models used to mathematically normalize $\delta^{13}\text{C}$ values for lipid contents require a proportion of the original dataset for estimating parameters specific to tissue, while chemical extraction of lipids necessitates the process of all samples. Here we combined data of the three tuna species despite the fact that some differences were highlighted by statistical tests. We then increased the amount of data and improved the precision of the parameters' estimation process. Species- or sex-specific models (results not shown) did not make better the predictions and led to very close parameters' values confirming that tissue is the most important factor to consider in lipid correction models, as already noted by Logan et al. (2006). However extrapolation to other species or tissues should not be performed without estimating specific parameters.

As already mentioned, white muscle of BET, SKJ and YFT did not require lipid removal and any correction model would provide a suitable correction for trophic investigations, regarding the small difference between bulk and lipid-free $\delta^{13}\text{C}$ values (around 0.1‰). A mean error of more or less 0.1‰ in $\delta^{13}\text{C}$ values would not alter ecological interpretation and is in the range of the measurement error of the device as well. However, when multi-tissue SIA are carried out using fatter tissues or when comparative studies aim at investigating the role and position of different species in marine food webs, samples have to be processed in the same way, i.e. chemical lipid extraction or normalization using specific mathematical models. Although

expensive, chemical extraction has the advantage to gain additional valuable information such as the total lipid content of tissues, which is commonly used as a proxy of nutritional and/or energetic condition of fish (Adams, 1999; Pethybridge et al., 2014; Weber et al., 2003).

5.5.2 Tissue metabolism and isotopic composition

Strong differences were observed in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values among the tissues of the three tuna species. Tissues showed indeed a large variability in lipid and protein contents, and metabolism affects most likely isotopic composition. Hereafter the objective is not to interpret our findings in a trophic context but to discuss physiological factors that could influence our isotopic results. Among the two types of tuna muscles, red muscle accounts for less than around 10% of the total body weight, depending on the fish species and size (Graham et al., 1983). Indeed, due to increased endothermic efficiency with age, the proportion of red muscle tends to decrease (Graham et al., 1983). Red and white muscles have different functions in tuna. White muscle is activated during fast and short-duration swimming bursts fueled by catabolized glycogen and anaerobic metabolism. In contrast red muscle is activated during routine swimming and is based on aerobic lipids catabolism (i.e. fatty acid degradation for energy production) (Arthur et al., 1992; Dickson, 1996). Indeed, storage lipids are rather found in red muscle compared to white muscle (Figure 5.2). Catabolism preferentially uses and excretes light isotopes. In the case of red and white muscles, catabolized substrates have different isotopic signatures: lipids are depleted in $\delta^{13}\text{C}$ relatively to glycogen (DeNiro and Epstein, 1977). This could explain the lower $\delta^{13}\text{C}$ values observed in the red muscle compared to white muscle in this study.

However, lipid metabolism could also have specific preferences that will influence the isotopic composition. Sidell et al. (1995) noted that some monounsaturated fatty acids are preferentially used for energy metabolism in the muscle of an Antarctic fish. As fatty acids could have different $\delta^{13}\text{C}$ values according to their origins (Budge et al., 2008), the resulting carbon pool could be differentially affected. In addition, Koussoroplis et al. (2010) showed that fatty acids from structural (PL) or storage (TAG) lipids have different $\delta^{13}\text{C}$ values in the grey mullet, thus proportion and use of each lipid class could influence isotopic composition of each tissue. Similarly, McMahon et al. (2010) showed that fish muscle $\delta^{13}\text{C}$ values is greatly influenced by the amino acids available in the diet and by the metabolic ways activated to synthesize the missing ones.

Nitrogen isotopic composition depends on the amino acid metabolism through deamination and transamination processes (Macko et al., 1986). Tissues with high protein turnover (i.e., ratio between protein degradation and synthesis) excrete lighter nitrogen leading to a ^{15}N -enrichment. In this way, higher $\delta^{15}\text{N}$ values are expected in liver which is characterized by faster turnover than muscles in fish (e.g. MacNeil et al., 2005; Buchheister and Latour, 2010; Olson et al., 2010). However, in tropical tuna, the lower $\delta^{15}\text{N}$ values observed in liver compared to muscle (Graham et al., 2006, this study) suggest that other factors are at play such as tissue growth (higher proteins synthesis) or tissue specific metabolism. Indeed liver contains high levels of proteins and plays a central function in amino acid and fatty acid metabolism and their exchange with other tissues (Brusle and Anadon, 1996). Its isotopic composition should be greatly influenced by compounds brought by diet or their synthesis and degradation for the organism requirement. Lower $\delta^{15}\text{N}$ values could also suggest low reuse of proteins on site, thus protein are rapidly transferred in other tissues. Details in essential and non-essential amino acid and fatty acid proportions would improve our conclusions in terms of compound distribution from the liver to tissues.

On the other hand, in the red muscle of teleost fish, glutamine, a non-essential amino acid, is catabolised by mitochondria “on site” (not in liver like in mammals) in addition to fatty acid metabolism (Chamberlin

CHAPITRE 5. MÉTHODES DE NORMALISATION DES LIPIDES POUR L'ANALYSE ISOTOPIQUE DES TISSUS DE THON

et al., 1991; Ballantyne, 2004). This characteristic of red muscle could explain its high $\delta^{15}\text{N}$ values although it contains lower proportion of proteins compared to other tissues (Figure 5.2). The differences of total protein contents between the two types of muscle may be linked with their myofibrillar protein levels: while muscle cells typically contain a high quantity of these compounds, red muscle is characterized by a lower fiber diameter and thus a lower myofibrillar protein level to ensure the efficiency of its large number of mitochondria (Dickson, 1996; George and Stevens, 1978). Starvation may also cause a tissue ^{15}N enrichment but these situations seems unlikely in tuna who have high energetic requirements: experiments on SKJ and YFT have actually disclosed a limited ability to survive starvation (Boggs and Kitchell, 1991).

Gonads were the only tissue that showed sex difference in isotopic composition: C:N ratio increased with maturity (i.e., GSI) in females. However the decrease in male gonads is constrained by C:N ratio in non mature males (i.e., $\text{GSI} < 1.5$, Figure 5.3). The variation in proximal composition supports this pattern: proteins and reserve lipids were more abundant in female gonads of BET and SKJ (Figure 5.2) and this is probably linked to the different requirements between ovary and testis during maturation process. In females, liver products vitellogenin (Vtg), a large glycolipoprotein intended to energy storage in eggs. A greater Vtg accumulation in bluefin tuna *Thunnus thynnus* was suggested to be correlated with diet quality and especially with diet dominated by squid, which are rich in protein and phospholipids (Pousis et al., 2011). Thus diet quality could influence the ovary isotopic composition. Further studies suggest also that oleic acid, a specific fatty acid, is preferentially used in females for the yolk supply in fish (Ballantyne et al., 1996; Huang et al., 2010). High levels of PolyUnsaturated Fatty Acids (PUFA) in eggs are also correlated with better quality and fecundity in many fish species (Yanes-Roca et al., 2009; Bachan et al., 2012). By this way, maternal investment could also affect ovary isotopic composition. But sperm is rich in ATP and glucose, which are essential for its mobility. The nucleotide concentration (ATP-ADP-AMP) could therefore be used as an indicator of sperm quality (Zilli et al., 2004). Many differences of compounds during maturation could thereby explain differences in isotopic composition among sexes.

Moreover, differences in gonad $\delta^{13}\text{C}$ values were also observed among tuna species. Indeed different reproductive strategies are observed for the three species (Grande et al., 2012, 2014; Zudaire et al., 2013a,b, 2014). The reproductive investment of SKJ females mobilizes more energy storage by means of lipid than males, which is common in fish. However more analyses on energy allocation strategy of these species are required to better understand the isotopic routing, and thus the isotopic composition of ovary and testis. Lastly our results showed that the reproductive investment of the three species did not truly depend on the energy storage in the other tissues, as variation in isotopic or in biochemical compositions with GSI were observed in gonads only. The understanding of isotopic routing is an important step required to improve multi-tissue isotopic studies. Indeed the multi-tissue approach promises interesting results on tropical tuna. For example, Graham et al. (2006) detected a diet shift at 45-50cm FL in Pacific YFT by comparing isotopic results in muscle and liver on the one hand and stomach contents on the other hand.

Conclusion

Mathematical corrections of lipid content can be applied on bulk $\delta^{13}\text{C}$ values of white and red muscles, liver and gonads of yellowfin, bigeye and skipjack tuna. However parameters have to be estimated from a proportion of the original data for which chemical extraction is required and isotopic values of bulk and lipid-free tissues are measured. On the one hand, we recommend using the linear model of Post et al. (2007) for tuna tissues with a similar range of lipid content (0.3-45%), as it was the most simple to implement with our dataset. On the other hand the mass balance approach was not suitable for correcting bulk $\delta^{13}\text{C}$ values of red

muscle, liver and gonads of tuna. Models using published parameters' estimates from other species cannot be used to account for lipid correction in trophic studies using SIA. Multi-tissue stable isotope analyses help to disentangle the complex relations between diet, physiological condition (growth, reproduction, starvation...) and the tissue-specific metabolism. The proportions of essential and non-essential fatty acids and amino acids metabolized in fish tissues shape isotopic composition, and compound-specific isotopic analyses would improve our understanding of tissue metabolism.

Acknowledgements

We are grateful all the SFA technicians lab and in particular Maria Cedras, Greg Burke and Rodney Melanie for their help throughout the tuna sampling. We wish also to thank the contributions of the IRD/SFA/IEO samplers, purse-seine fishermen, and of Patrice Dewals and Emmanuel Chassot of the IRD Tuna Observatory (UMR MARBEC, Seychelles). We thank also Hervé Guillou and his team (UMR TOXALIM, Toulouse, France) for their help in the preparation of the samples of lipid class and protein analyses. Finally we thank the three anonymous referees for their remarks and suggestions that greatly improved the manuscript. This work is a contribution to the projects EMOTION, CANAL and ALECAP, respectively founded by ANR, MW Brands IOT Ltd. and France Filière Pêche.

Chapitre 6

Compétition trophique et changements alimentaires ontogéniques chez les thons tropicaux

Les trois thons tropicaux sont sympatriques et sont donc le plus souvent retrouvés en bancs mixtes structurés par la taille (Chassot et al., 2015). Les études trophiques basées sur les contenus stomacaux mettent en évidence des proies différentes chez les thons capturés en surface (i.e. à la senne) ou en profondeur (i.e. à la palangre), avec une plus grande proportion de céphalopodes dans ces derniers (voir section 1.2.4). Cependant, les thons en banc mixte sont généralement agrégés pour chasser et leurs contenus stomacaux sont donc similaires, laissant supposer que ces espèces pourraient être en compétition pour leurs ressources alimentaires. Or, la compétition est une contrainte importante pour la coexistence des espèces des poissons, notamment en cas de raréfaction des ressources en proies, mais aussi d'un point de vue énergétique, puisqu'elle implique une dépense accrue notamment liée à l'accroissement de la recherche de nourriture (White and Warner, 2007; Persson, 1988). D'autre part, selon la théorie des niches écologiques, attribuée à Georges Hutchinson (1957), deux espèces coexistant dans le même écosystème ne peuvent pas occuper exactement la même niche écologique. Dans le cas spécifique des niches trophiques (un sous-ensemble de la niche écologique au sens de Hutchinson), qu'en est-il lorsque les thons vivent en bancs mixtes ? Des différences alimentaires entre espèces et/ou ontogéniques permettent-elles de limiter la compétition, ou l'énergie assimilée est-elle toujours de même nature ?

L'objectif de cette partie était donc d'évaluer le niveau de compétition trophique entre les thons tropicaux (i.e. différences alimentaires inter-spécifiques) et de déterminer d'éventuels changements alimentaires ontogéniques à l'origine de différences d'énergie assimilée (i.e. différences alimentaires intra-spécifiques). Pour cela, les thons étudiés provenaient de bancs mixtes. Comme il n'était pas possible de savoir depuis combien de temps les thons étaient agrégés dans un même banc, nous avons utilisé une approche combinant différents traceurs trophiques (les isotopes stables du carbone et de l'azote et les acides gras des lipides neutres) analysés sur deux tissus somatiques au temps d'intégration différent (foie et muscle blanc), et permettant un reflet du régime alimentaire plus global que les contenus stomacaux. Grâce aux outils dérivés de l'écologie fonctionnelle développés par Cucherousset and Villéger (2015), nous avons cherché à déterminer les niches isotopiques et lipidiques de ces espèces afin d'évaluer leur niveau de chevauchement, et considéré parallèlement les facteurs

CHAPITRE 6. COMPÉTITION TROPHIQUE ET CHANGEMENTS ALIMENTAIRES ONTOGÉNIQUES CHEZ LES THONS TROPICAUX

biologiques (taille, sexe, maturité) et environnementaux (saison, zone de pêche) pouvant être à l'origine de différences alimentaires.

Les comparaisons inter-spécifiques ont mis en évidence un niveau de compétition relativement élevé entre les poissons de petites tailles (< 100 cm), bien que les juvéniles *Thunnus obesus* se nourrissent de proies de niveau trophique légèrement supérieur (composition isotopique en azote plus élevée). *Katsuwonus pelamis* présente également un régime alimentaire globalement plus riche en AGPI que les juvéniles des deux autres espèces, probablement lié à une plus forte consommation de crustacés (voir section 1.2.4), proies riches en AGPI (Piché et al., 2010). Alors que la taille maximale atteinte par *K. pelamis* semble contraindre cette espèce à une compétition durable avec les juvéniles de *T. albacares* et *T. obesus*, ces deux derniers présentent un changement alimentaire ontogénique, autour de 100 cm pour le premier et 90 cm pour le second. Chez ces deux espèces, ce changement se traduit notamment par l'introduction de plus en plus importante de proies riches en AGMI, en particulier de 18:1ω9, au détriment de proies riches en AGPI. L'origine principale de ces AGMI serait les myctophidés, petits poissons des profondeurs effectuant des migration nycthémerales entre les couches profondes (environ 400 m) et de surface, servant directement de proies aux thons ou indirectement au travers des céphalopodes, qui sont consommés par les thons et se nourrissent aussi de ces myctophidés. Dans un même temps, la compétition trophique entre *T. albacares* et *T. obesus* reste limitée voire diminue avec la taille, puisque *T. obesus* se maintient sur un niveau trophique supérieur, laissant supposer qu'il s'alimente généralement sur les proies de taille supérieure. La composition isotopique particulière de *T. obesus* ($\delta^{13}\text{C}$ inférieur à *T. albacares* mais $\delta^{15}\text{N}$ supérieur) a été attribuée à une alimentation directe ou indirecte d'une proportion plus forte de certaines espèces de myctophidés aux signatures isotopiques particulières (e.g. *Diaphus metopoclampus* ; Ménard et al., 2014). Enfin, bien qu'aucune différence ontogénique ne soit observée chez *K. pelamis*, les compositions hépatiques en acides gras neutres présentent des différences sexuelles suggérant une allocation d'énergie à la reproduction variable en fonction du sexe : les proportions d'AGPI sont plus élevées dans le foie des mâles, alors qu'aucune différence sexuelle n'a été détectée chez les deux autres espèces.

Ainsi, des différences alimentaires entre espèces et ontogéniques ont été mises en évidence chez les thons tropicaux. Ces spécificités peuvent être associées à des différences d'utilisation de l'énergie assimilée (e.g. stockage, ré-allocation de l'énergie à la reproduction) et pourraient donc avoir des implications physiologiques.

Manuscrit B : soumis à Progress in Oceanography

Trophic niches of sympatric tropical tuna in the Western Indian Ocean inferred by stable isotopes and neutral fatty acids

Fany Sardenne^{1,2}, Nathalie Bodin², Emmanuel Chassot², Aurélien Amiel^{1,3}, Edwin Fouché^{1,3}, Maxime Degroote¹, Stéphanie Hollanda⁴, Heidi Pethybridge⁵, Benoit Lebreton⁶, Gaël Guillou⁶ & Frédéric Ménard⁷

¹ IRD, UMR MARine Biodiversity Exploitation and Conservation (MARBEC), Sète, FRANCE.

² IRD, UMR MARBEC, Victoria, SEYCHELLES.

³ INRA, UMR TOXALIM, Research Centre in Food Toxicology, Toulouse, FRANCE.

⁴ Seychelles Fishing Authority (SFA), Victoria, SEYCHELLES.

⁵ CSIRO Oceans and Atmosphere Flagship, Hobart, AUSTRALIA.

⁶ CNRS-Université de la Rochelle, UMR Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), La Rochelle, FRANCE.

⁷ IRD, Mediterranean Institute of Oceanography (MIO), Marseille, FRANCE.

Key-words: niche area; competition; mixed-school; ontogenetic changes; trophic tracers.

6.1 Abstract

This study examined the trophic ecology of three sympatric tropical tuna species (bigeye BET, skipjack SKJ, and yellowfin YFT) sampled in the Western Indian Ocean throughout 2013. Specifically we explored inter-specific resource partitioning and ontogenetic variability using neutral fatty acids and stable isotope analysis of liver and muscle from small (≤ 100 cm fork length, FL) and large (> 100 cm FL) tuna collected in mixed schools at the surface by purse-seine. Both biochemical tracers were used to calculate trophic niche indices that collectively revealed high potential for resource competition, especially among small tunas. Resource overlap appeared strongest between BET and YFT, with SKJ tissues having lower nitrogen isotope ($\delta^{15}\text{N}$) values ($11.4 \pm 0.6\text{‰}$), high carbon isotope ($\delta^{13}\text{C}$) values ($-17 \pm 0.3\text{‰}$), and higher relative proportion of poly-unsaturated fatty acids (PUFA) than the two other species, indicating a different diet. Size was found to be a strong predictor for most biochemical tracers in the three species with $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$ values and total lipid content in the liver. In the larger species (YFT and BET), proportions of mono-unsaturated fatty acids typically increasing with size, while quantities of PUFA decreased. In addition to ontogenetic variability, trophic markers were shown to vary between sampling area and season: higher lipid reserves

CHAPITRE 6. COMPÉTITION TROPHIQUE ET CHANGEMENTS ALIMENTAIRES ONTOGÉNIQUES CHEZ LES THONS TROPICAUX

and $\delta^{15}\text{N}$ values, and lower $\delta^{13}\text{C}$ values occurred during monsoon periods around Seychelles than in the Mozambique Channel (parted from about 1500 km). Our multi-tracer approach reveals the magnitude of competitive interactions in mixed tropical tuna schools at both small and large sizes and demonstrates that ontogenetic niche differentiation acts as a major factor of coexistence in tropical tunas.

6.2 Introduction

Three principal market tropical tuna species, bigeye (*Thunnus obesus*; BET), skipjack (*Katsuwonus pelamis*; SKJ) and yellowfin (*T. albacares*; YFT), occur in the pelagic environment in schools, often mixed, that are largely targeted by industrial tuna fisheries including purse seine. In all oceans, tropical tuna schools display specific compositions with SKJ, whose size does not exceed one meter, generally recovered with juvenile BET and YFT, while adults of these two species, whose size may exceed two meters, can be found together (Fonteneau et al., 2000; Hare et al., 2015). Indeed, diving abilities increase with size in BET and YFT and result in deeper vertical distribution with age, whereas SKJ is more vertically confined to the surface layers due to lack of swim-bladder and higher oxygen requirement (Graham and Dickson, 2004). In the purse seine fishery of the Western Indian Ocean, small tunas (fork length; $\text{FL} \leq 100$ cm) mainly aggregate under floating objects in mixed schools and large tuna ($\text{FL} > 100$ cm) mainly form free-swimming schools, although some large fishes are also associated with floating objects (Chassot et al., 2015). Sympatry of tropical tunas in mixed schools suggests possible competition for trophic resources, particularly where resources are limited.

The trophic ecology of tropical tunas has mainly been investigated through stomach content analysis (SCA) which suggests that all species collectively display opportunistic predatory behaviour, feeding during the day on a large diversity of prey composed of small fish, crustaceans and cephalopods (Olson et al., 2014; Potier et al., 2004). Globally, diet composition has been shown to be influenced by local prey availability, fishing gear that corresponds to specific environmental characteristics (e.g. depth, time of the catch), and environmental conditions (Olson et al., 2014; Young et al., 2010b). In the Indian Ocean, crustaceans, mainly the swimming crab *Charybdis smithii* and *Natosquilla investigatoris*, were found to be the main prey of the three species, especially during the day time, followed by small fish like *Cubiceps pauciradiatus* and small scombridae (Potier et al., 2001; Grande, 2013; Zudaire et al., 2015; Potier et al., 2004). Cephalopods, especially the ommastrephids *Sthenoteuthis oualaniensis* and *Ornithoteuthis volatilis*, occurred mainly in BET and YFT diet (Potier et al., 2001; Ménard et al., 2013). In addition, feeding habits of tunas have been shown to vary between large individuals that are shallow and deep-dwelling (Potier et al., 2004). While large BET and YFT continue to feed on small preys, at equal size, BET hunt on larger prey than YFT (Ménard et al., 2006), and the average prey size increases with predator size in the tropical tunas (Jaquemet et al., 2011). Limited information is available on the diet of small-sized tuna, globally, with the exception of a study by Graham et al. (2006) who detected an ontogenetic shift in coastal YFT from Hawaii at around 50 cm FL.

Since SCA only provides a snapshot of the animal's diet (Cortés, 1997), alternative techniques capable of examining trophic relationships over longer time periods have been progressively introduced. Stable isotopes (SI) and fatty acids (FA) are two of the main trophic tracers currently used in trophic ecology as they have the advantage of reflecting nutrients assimilated over period of weeks to multi-years, depending on the rate at which they are incorporated from diet into consumer tissues and the turn-over of the tissues (Buchheister and Latour, 2010; Dalsgaard et al., 2003). SI of carbon (expressed as $\delta^{13}\text{C}$, ‰) details the origins of primary producers' with different values allowing primary feeding habitats to be differentiated (i.e. , continental vs. near shore marine vs. offshore marine; Clementz and Koch, 2001). Within an ecosystem,

SI of nitrogen (expressed as $\delta^{15}\text{N}$, ‰) provides a proxy of an animal's trophic position due to a predictable stepwise enrichment from the heavy to the light isotope between trophic levels. Profiles of FA can be used to examine the dynamics of predator-prey relationships, food web structure and energy fluxes (Iverson et al., 2004). Increasingly the importance for dietary studies to focus on FA stemming from storage lipids (i.e. neutral fatty acids, NFA) has been emphasized (Lee et al., 2006; Pethybridge et al., 2014) as they provide fuel for energetic demands and are transferred with limited modifications from prey to predator in comparison to structural lipids or other nutrients (Robin et al., 2003).

Trophic niche metrics (including nestedness, total niche area, niche widths, and niche overlap) derived from functional ecology have been recently adapted to stable isotope ecology (Layman et al., 2007; Cucherousset and Villéger, 2015) and have also been explored using FA (Pethybridge et al., 2014). Several species-specific studies have used SI or FA to investigate either tuna's trophic ecology (SI: Graham et al., 2006; Ménard et al., 2007a; Zudaire et al., 2015; FA: Saito et al. 1997; Parrish et al. 2013) or environmental changes (Lorrain et al., 2015; Pethybridge et al., 2015b,a). To our knowledge, no study has undertaken inter-specific comparisons of the three tropical tunas' diet at the same time (their niche partitioning) despite the ecological and economic significance of them co-occurring in mixed schools. This study aimed to examine the extent of resource partitioning among sympatric tropical tunas and with ontogeny for a given species in the Western Indian Ocean. By using a multi-tracer (SI and NFA) and multi-tissue (muscle and liver) approach, our comparative study provides valuable insights into how these co-occurring marine top-predators compete or partition space and prey resources.

6.3 Material and method

6.3.1 Tuna and tissue collection

the capture area from January to December, according to the information provided by the purse-seine logbook (the mean coordinates were used when several activities were grouped in purse-seine wells. All sampled wells contained activities comprised in a 5° square), to cover possible seasonal trophic changes; and (ii) tuna size, to examine ontogenetic dietary shifts. A total of 81 BET, 94 SKJ and 94 YFT were collected and processed at the laboratory where FL (in cm, taken from the tip of the snout to the fork of the tail), and sex (Indeterminate, I; Female, F; Male, M) were recorded for each individual. Maturity stage was based on macroscopic examination of the gonads and was used to group fish into two phases: developing (Dev, i.e., immature to developing fish), and spawning (Spa, i.e., spawning capable to resting fish; Brown-Peterson et al., 2011). Table 6.4 gives details of the number of samples analyzed for each fish descriptor, i.e. size class, sex, season, capture area and maturity stage. Two sub-samples of around 2 g (wet weight, ww) were taken from the dorsal white muscle (sampled under the dorsal spine on the left side) and the liver of each fish, and frozen in the following 20 min. All samples were stored at -80°C until further analyses.

6.3.2 Trophic tracer analyses

The detailed procedures are presented in the Electronic Supplementary Material. A total of 520 samples (251 livers and 269 muscles) were analyzed for total lipid content (TLC), $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ according to the methods of Bodin et al. (2009) and Sardenne et al. (2015b). Briefly, TLC of each sample, expressed in% of dry weight (dw), was estimated by Accelerated Solvent Extraction with dichloromethane. $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ were analyzed together on dried lipid-free samples using a Delta V Advantage isotope ratio mass spectrometer interfaced

CHAPITRE 6. COMPÉTITION TROPHIQUE ET CHANGEMENTS ALIMENTAIRES ONTOGÉNIQUES CHEZ LES THONS TROPICAUX

to a Flash EA 1112 elemental analyzer (Thermo Scientific). Analytical precision for both $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ was $<0.15\text{‰}$ based on replicate measurements of internal laboratory standard (acetanilide and peptone, Thermo Scientific).

A total of 367 samples (180 livers and 187 muscles) were selected for the analysis of neutral fatty acids (NFA). Compounds were separated on a TRACE 1310 gas chromatograph equipped with a FAMEWAXTM column (30 m, 0.32 mm internal diameter, Restek) and a flame-ionization detector (Thermo Scientific). NFA results were expressed in % as a relative abundance of total identified compounds.

6.3.3 Data analyses

Variations in TLC, $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values, and NFA between tuna species were investigated to test the effects of fish size, habitat (i.e. fishing area) and season. Two distinct size classes based on the aggregative behavior were considered ($\text{FL} \leq 100\text{cm}$ and $> 100\text{cm}$). As previous studies highlighted the peculiarity of the Mozambique Channel (MOZ) in term of productivity (Potier et al., 2014), this sampling area was analyzed separately from the Western-Central Indian Ocean (WCIO; Fig. 6.1). Finally, the monsoon circulation results in a strong seasonal variability in oceanographic features and biological productivity in the Indian Ocean (Schott and McCreary Jr., 2001), with subsequent effects on tuna preys such as mesopelagic fishes (Vipin et al., 2012). Hence, four distinct seasons were considered in subsequent analyses: North-Eastern Monsoon (NEM) from mid-November to mid-March, South Western Monsoon (SWM) from mid-May to mid-September, Spring Inter-Monsoon (SIM) from mid-March to mid-May, and Autumn Inter-Monsoon (AIM) from mid-September to mid-November. However, season was excluded from area/season interaction tests because the sampling was unbalanced between these two variables (Table 6.4) in relation to tropical tuna seasonal migration (Kaplan et al., 2014).

A total of 27 NFA accounting each for $>0.8\%$ in all samples cumulated (i.e., the most representative) were kept for statistical analyses and arc-sinus root squared transformed to improve normality and homoscedasticity (Underwood, 1997). Permutational multivariate analyses of variance (PERMANOVA) based on Euclidean distance matrix were first performed on NFA profiles of muscle and liver separately to test the effects of species, size class, area and season. Non-metric multidimensional scaling (NMDS), also based on the Euclidean distance matrix, was then used to compare the samples through the relative dissimilarity in NFA profiles among tested groups. NMDS is a rank-based approach that aims to summarize the information provided by a large set of dimensions. Here, a set of three dimensions was considered and an optimal configuration of the individuals was based on a maximum limit value of 0.1 for the stress (i.e. goodness-of-fit index). The samples coordinates in the three dimensions of the NMDS were subsequently used to investigate the ontogenetic changes in fatty acid composition in each tuna species. Differences in individual NFA compounds were assessed using Wilcoxon's tests, pairwise tests being used when more than two means were compared. Analysis of variance (ANOVA) was finally performed on $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$ and TLC, and followed by Tukey's honestly significant difference (HSD) post hoc tests.

Ontogenetic changes in trophic tracers in each tissue were investigated for each species using Generalized Additive Models (GAMs; Hastie and Tibshirani, 1990). FL was used as a proxy of age because of the difficulties associated with age estimation in tropical tunas (Sardenne et al. 2015a). Sex of the fish (S) and maturity stage (D) were included in the model in addition to sampling area (A) and season (M) following:

$T_i = a + s(\text{FL}_i) + A_i + M_i + S_i + D_i + \varepsilon_i$, with T is the trophic tracer ($\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$, TLC or MDS scores of NFA profiles), a the intercept, s the spline function smoother (with no preset value concerning the amount of smoothing), i indicate fish of a given species, and ε is the random noise term assumed to be normally

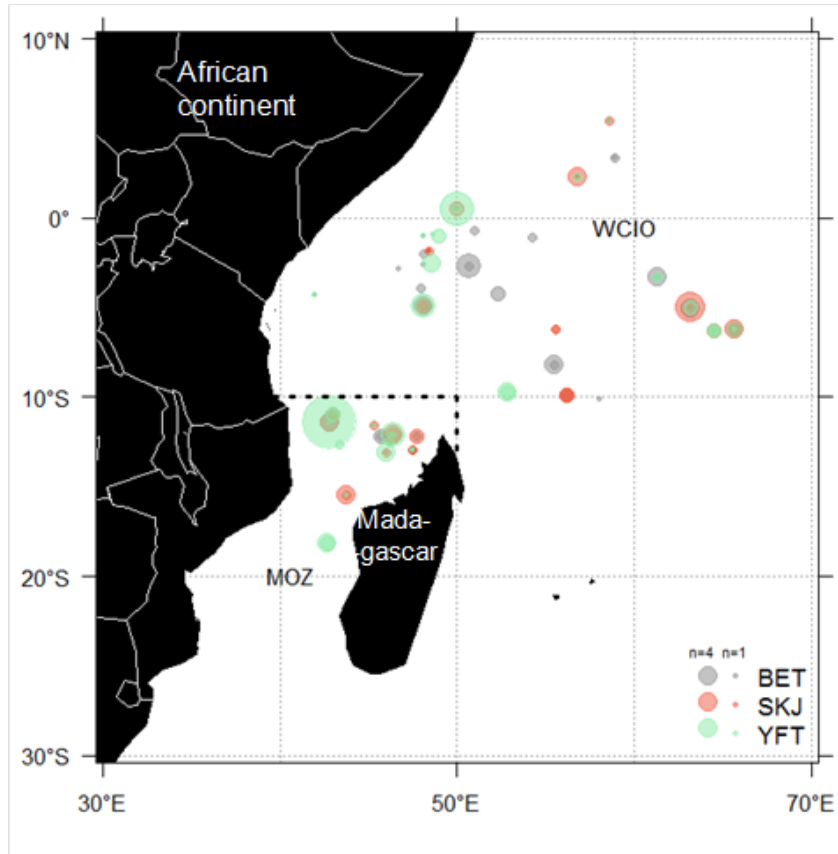


Fig. 6.1: Location of skipjack tuna (SKJ), yellowfin tuna (YFT) and bigeye tuna (BET) caught in the Western Indian Ocean throughout 2013. The limit of the two study areas, Mozambique Channel (MOZ) and Western-Central Indian Ocean (WCIO), is indicated with a dashed line.

distributed with mean zero and constant variance. The best model was selected using Aikake Information Criterion (AIC), and ANOVAs were used to detect significant effects of covariates. When a significant size effect was detected on NFA profiles in a given tissue (Table 6.6a), the initial model was also applied on the three main NFA families (mono-unsaturated FA, MUFA; poly-unsaturated FA, PUFA; and saturated FA, SFA) and essential NFAs (i.e. 22:6 ω 3; 20:5 ω 3; 20:4 ω 6; 18:2 ω 6; 18:3 ω 3; Arts et al., 2001) to investigate how they vary with size.

Species-specific indices of nestedness based on SI or NFA of species (i.e. convex hull areas or volumes) were calculated to compare tunas' trophic niches as described in Cucherousset and Villéger (2015). Convex hull allows integration of organisms positioned at the edge of SI or NFA niches. Indices of nestedness are the ratio between the niche volume shared and the minimal volume filled by a group. It ranges between 0 and 1: 0 indicates no overlap between the two trophic niches and 1 a perfect overlap (or that the lowest volume is fully contained in the larger one). It was computed on an isotopic 2D standardized space, where each axis is scaled to have the same range (e.g. 0–1) for the each stable isotope (INes; Cucherousset and Villéger, 2015), and on a fatty acid 3D space (FANes), stemming from NMDS coordinates. These two indices were calculated to compare species trophic niches, according to size class and sampling area, using bootstrapping to overcome differences in the number of individuals per species.

All statistical analyses were performed using R 3.0.2 software. The *vegan* library (Oksanen et al., 2015) was used for PERMANOVA and NMDS and the *mgcv* library (Wood and Wood, 2015) was used for GAMs models fittings. Indices of nestedness were calculated using the published R code of Cucherousset and Villéger (2015).

6.4 Results

6.4.1 Inter-specific differences

TLC comparisons

TLC was significantly higher in liver ($15\pm 8\%$) than muscle ($3\pm 2\%$, Tukey HSD, $P<0.0001$; Table 6.1). Muscle TLC did not vary with season, area, size class or species (Table 6.2). Liver TLC significantly varied with size class and season, but similarly to muscle, no differences were highlighted in liver samples either (Table 6.1). According to post-hoc Tukey HSD comparisons, large tuna presented higher lipid-rich livers than small tuna (TLC = $22\pm 11\%$ and $14\pm 6\%$, respectively, $P<0.0001$). Tuna liver was also characterized by significant lower TLC during Spring Inter-Monsoon than during the monsoon periods with tunas sampled during this period being $4\pm 7\%$ leaner than North-Eastern Monsoon ($P<0.05$) and $5\pm 2\%$ leaner than South-Western Monsoon ($P<0.001$). While ANOVA showed that there was a significant influence of area on TLC in both tissues in each size class (Table 6.2), post-hoc tests detected no TLC differences between area in each size class in liver (small and large size classes, $P=0.80$ and $P=0.29$ respectively) and muscle ($P=0.12$ and $P=0.05$ respectively).

NFA profiles

NFA profiles for all tunas were consistently dominated by saturated compounds (means ranging from 42 to 49%, Table 6.1), that remained constant across size classes. However, varying importance of PUFAs (17–40%) and MUFAs (13–35%, Table 6.1) was observed. Among the species, the most common NFA in both tissues, in decreasing order of importance, were typically: 16:0 ($32\pm 7\%$), 22:6 ω 3 (DHA; $19\pm 7\%$), 18:1 ω 9 ($13\pm 7\%$) and 18:0 ($11\pm 3\%$). There were significant differences in NFA profiles between tissues, with muscle having higher proportions of PUFA and especially of DHA than liver ($33\pm 9\%$ vs. $29\pm 9\%$, $W=13379$, $P<0.001$; DHA: $21\pm 7\%$ vs. $17\pm 6\%$, $W=10364$, $P<0.0001$).

For both tissues, differences in NFA profiles were observed among size classes, species, areas and seasons, in decreasing order of importance. Interactions among size classes and species and among species and area were also detected in muscle (both $p<0.05$), when a significant interaction between size classes and area was detected in liver ($p<0.01$; Table 6.2).

In both tissues, small tunas (≤ 100 cm FL) generally had higher proportions of PUFA ($32\pm 8\%$ in liver and $35\pm 9\%$ in muscle, the three species combined) than larger tuna (PUFA: $22\pm 10\%$ in liver and $29\pm 8\%$ in muscle, YFT and BET combined; both $p<0.0001$), and especially of essential PUFA (e.g. in liver: DHA: $18\pm 5\%$ vs. $12\pm 6\%$; EPA: $5\pm 2\%$ vs. $3\pm 2\%$ and AA: $4\pm 1\%$ vs. $3\pm 2\%$). In contrast, MUFA were higher in large tuna, within both liver ($32\pm 10\%$ vs. $21\pm 8\%$, $W=5315$, $p<0.0001$) and muscle ($25\pm 6\%$ vs. $18\pm 6\%$, $W=5442$, $P<0.0001$). Levels of SFA remained similar between size class: $46\pm 7\%$ in liver ($W=2954$, $P=0.28$) and $47\pm 9\%$ in muscle ($W=2886$, $P=0.16$), with limited differences in individuals SFA (mean difference $<2\%$ for 15:0 and 17:0 in liver and 14:0, 18:0 and 20:0 in muscle).

Among the species, higher PUFA proportions were found in SKJ liver and muscle ($32\pm 8\%$ and $38\pm 9\%$, respectively) than in the two other species (on average $27\pm 9\%$ and $31\pm 8\%$ for liver and muscle respectively for YFT and BET, small and large specimens combined, all $P<0.0001$). DHA mainly contributed to these inter-specific discriminations, with higher proportions in SKJ ($20\pm 6\%$ and $24\pm 6\%$ in liver and muscle, respectively), while BET and YFT had similar proportions (on average $15\pm 6\%$ and $20\pm 6\%$ in liver and muscle, respectively). In contrast, regardless of size class, in both tissues MUFA proportions were lowest in BET followed by YFT then SKJ (e.g. in liver, $30\pm 10\%$ in BET, $25\pm 11\%$ in YFT and $18\pm 6\%$ SKJ, small and large specimens

Table 6.1: Mean values (\pm standard deviation) of carbon and nitrogen isotopic data ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, ‰), total lipid content (% dw) and fatty acid profiles (neutral lipids as a % of total fatty acids) of the liver and muscle of skipjack tuna (SKJ), yellowfin tuna (YFT) and bigeye tuna (BET) in the Western-Central Indian Ocean, according to size class (FL<100 cm and FL>100 cm). N is the number of samples for SI and NFA analyses. Superscripts represent significantly $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, TLC and NFA differences among species (P<0.05 for Wilcoxon's test): B different from BET; S different from SKJ; Y different from YFT.

	Small tunas (FL<100 cm)						Large tunas (FL>100 cm)					
	Liver			Muscle			Liver			Muscle		
	BET	YFT	SKJ	BET	YFT	SKJ	BET	YFT	SKJ	BET	YFT	SKJ
N (SI/NFA)	33126	29124	43146	33128	29123	43147	27124	23119	43147	27121	23119	43147
$\delta^{13}\text{C}$	-17.6 \pm 0.4	-17.5 \pm 0.4	-17.7 \pm 0.4	-17.2 \pm 0.3	-17.0 \pm 0.4	-17.0 \pm 0.3	-17.4 \pm 0.5	-17.1 \pm 0.5	-17.0 \pm 0.3	-17.0 \pm 0.2	-16.6 \pm 0.3	-16.6 \pm 0.3
$\delta^{15}\text{N}$	11.8 \pm 0.6	11.4 \pm 0.5	10.8 \pm 0.6	12.5 \pm 0.7	11.7 \pm 0.6	11.4 \pm 0.6	11.8 \pm 0.5	11.0 \pm 0.5	11.4 \pm 0.6	13.4 \pm 0.4	12.4 \pm 0.6	12.4 \pm 0.6
TLC (% dw)	13.8 \pm 5.0	13.9 \pm 8.3	14.4 \pm 5.7	2.7 \pm 1.9	2.0 \pm 1.0	3.1 \pm 3.5	20.0 \pm 8.8	27.3 \pm 11.2	25.1 \pm 1.3	22 \pm 1.0	25 \pm 1.3	25 \pm 1.3
14:0	1.3 \pm 0.9	1.2 \pm 0.6	1.7 \pm 0.9	1.2 \pm 1.2	0.7 \pm 0.5	0.6 \pm 0.5	1.1 \pm 0.6	1.4 \pm 0.8	0.8 \pm 0.4	0.8 \pm 0.4	1.1 \pm 0.9	1.1 \pm 0.9
15:0	0.8 \pm 0.4	0.8 \pm 0.4	1.0 \pm 0.4	0.5 \pm 0.4	0.4 \pm 0.3	0.4 \pm 0.4	0.5 \pm 0.4	0.5 \pm 0.3	0.4 \pm 0.3	0.4 \pm 0.3	0.6 \pm 0.4	0.6 \pm 0.4
16:0	30.6 \pm 4.5	33.4 \pm 4.7	36.1 \pm 7.0	30.8 \pm 8.0	30.6 \pm 9.4	32.8 \pm 8.7	31.7 \pm 4.0	35.7 \pm 4.3	29.5 \pm 8.8	29.5 \pm 8.8	29.6 \pm 8.8	29.6 \pm 8.8
17:0	1.4 \pm 0.5	1.6 \pm 0.7	1.6 \pm 0.7	1.3 \pm 0.3	1.3 \pm 0.3	1.2 \pm 0.4	1.0 \pm 0.6	1.2 \pm 0.5	1.2 \pm 0.2	1.2 \pm 0.2	1.2 \pm 0.4	1.2 \pm 0.4
18:0	7.6 \pm 1.4	10.2 \pm 1.3	8.3 \pm 1.7	12.0 \pm 3.9	14.4 \pm 3.1	13.8 \pm 2.6	8.3 \pm 1.4	8.8 \pm 1.9	12.4 \pm 3.4	11.6 \pm 2.5	11.6 \pm 2.5	11.6 \pm 2.5
20:0	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.4 \pm 0.4	0.3 \pm 0.4	0.3 \pm 0.4	0.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.6 \pm 0.4	0.6 \pm 0.4	0.6 \pm 0.4	0.6 \pm 0.4
22:0	0.0 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.3	0.3 \pm 0.4	0.2 \pm 0.5	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.4 \pm 0.6	0.4 \pm 0.6	0.3 \pm 0.5	0.3 \pm 0.5
SFA	41.9 \pm 5.3	47.3 \pm 5.2	48.9 \pm 7.5	46.4 \pm 8.4	48.0 \pm 8.9	49.4 \pm 8.1	42.7 \pm 5.0	47.8 \pm 4.3	45.2 \pm 8.7	45.2 \pm 8.7	45.0 \pm 8.3	45.0 \pm 8.3
16:1n7	2.9 \pm 1.1	2.4 \pm 1.0	2.9 \pm 1.2	2.2 \pm 1.7	1.3 \pm 1.0	1.6 \pm 0.9	3.9 \pm 1.2	4.2 \pm 1.0	2.2 \pm 1.8	2.2 \pm 1.8	3.5 \pm 2.1	3.5 \pm 2.1
17:1n7	0.7 \pm 0.5	0.5 \pm 0.4	0.5 \pm 0.4	0.7 \pm 0.3	0.4 \pm 0.3	0.5 \pm 0.3	0.8 \pm 0.5	0.7 \pm 0.4	0.6 \pm 0.3	0.6 \pm 0.3	0.7 \pm 0.4	0.7 \pm 0.4
18:1n7	16.4 \pm 7.3	12.9 \pm 8.8	10.4 \pm 4.2	13.1 \pm 4.2	10.2 \pm 3.2	7.8 \pm 1.5	23.8 \pm 10.0	24.0 \pm 6.0	15.0 \pm 5.4	15.0 \pm 5.4	16.1 \pm 2.6	16.1 \pm 2.6
18:2n6	3.2 \pm 0.9	2.5 \pm 1.0	2.2 \pm 0.7	2.8 \pm 0.6	2.5 \pm 0.5	1.9 \pm 0.4	3.6 \pm 0.9	3.4 \pm 0.4	3.2 \pm 0.8	3.2 \pm 0.8	3.2 \pm 0.6	3.2 \pm 0.6
20:1n7	1.0 \pm 0.5	0.6 \pm 0.5	0.3 \pm 0.2	1.0 \pm 0.4	0.6 \pm 0.4	0.3 \pm 0.3	1.0 \pm 0.5	0.8 \pm 0.3	0.9 \pm 0.6	0.9 \pm 0.6	0.8 \pm 0.4	0.8 \pm 0.4
22:1n9	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	2.4 \pm 2.8	2.2 \pm 1.3	0.9 \pm 0.7	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	2.3 \pm 3.0	2.3 \pm 3.0	2.0 \pm 1.6	2.0 \pm 1.6
24:1n9	2.4 \pm 2.2	2.2 \pm 2.3	2.0 \pm 1.9	0.3 \pm 0.3	0.4 \pm 0.4	0.2 \pm 0.4	1.6 \pm 1.5	0.9 \pm 0.9	0.4 \pm 0.5	0.4 \pm 0.5	0.4 \pm 0.3	0.4 \pm 0.3
MUFA	26.8 \pm 8.5	21.0 \pm 10.2	18.2 \pm 5.4	22.6 \pm 6.7	17.5 \pm 4.1	13.3 \pm 2.1	34.8 \pm 11.0	34.2 \pm 6.9	24.6 \pm 7.8	24.6 \pm 7.8	26.8 \pm 3.9	26.8 \pm 3.9
18:3n3	0.5 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1	0.2 \pm 0.2	0.3 \pm 0.3	0.3 \pm 0.2	0.2 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1	0.3 \pm 0.2	0.3 \pm 0.4	0.3 \pm 0.4	0.4 \pm 0.3	0.4 \pm 0.3
20:5n3 (EPA)	4.9 \pm 1.4	5.1 \pm 1.6	5.6 \pm 1.9	3.9 \pm 0.7	3.8 \pm 0.8	5.0 \pm 0.9	3.4 \pm 1.5	2.5 \pm 1.3	3.5 \pm 0.9	3.5 \pm 0.9	3.5 \pm 0.9	3.5 \pm 0.9
22:5n3	1.2 \pm 0.5	1.0 \pm 0.8	0.9 \pm 0.6	0.7 \pm 0.5	0.9 \pm 0.7	0.4 \pm 0.5	1.0 \pm 0.6	1.1 \pm 0.6	0.7 \pm 0.6	0.7 \pm 0.6	0.8 \pm 0.5	0.8 \pm 0.5
22:6n3 (DHA)	16.6 \pm 5.3	17.6 \pm 4.6	19.1 \pm 5.6	20.1 \pm 5.1	22.7 \pm 6.7	23.6 \pm 6.2	12.0 \pm 5.6	9.4 \pm 4.0	18.9 \pm 6.3	18.9 \pm 6.3	16.7 \pm 5.2	16.7 \pm 5.2
18:2n6	0.9 \pm 0.4	1.1 \pm 0.3	0.8 \pm 0.3	1.0 \pm 0.4	1.4 \pm 0.4	1.1 \pm 0.3	0.6 \pm 0.4	0.7 \pm 0.5	1.1 \pm 0.4	1.1 \pm 0.4	1.3 \pm 0.4	1.3 \pm 0.4
18:3n6	0.3 \pm 0.4	0.2 \pm 0.2	0.3 \pm 0.3	0.1 \pm 0.2	0.2 \pm 0.4	0.1 \pm 0.2	0.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.2	0.2 \pm 0.2	0.3 \pm 0.5	0.3 \pm 0.5
20:2n6	0.3 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.2	0.1 \pm 0.3	0.2 \pm 0.4	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.2	0.2 \pm 0.2	0.1 \pm 0.2	0.1 \pm 0.2
20:3n6	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.1	0.1 \pm 0.3	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.3	0.1 \pm 0.3
20:4n6 (AA)	4.5 \pm 1.6	4.2 \pm 1.6	3.7 \pm 1.1	2.9 \pm 0.6	2.7 \pm 0.6	4.0 \pm 1.1	3.4 \pm 1.8	1.9 \pm 0.8	3.1 \pm 0.9	3.1 \pm 0.9	2.6 \pm 1.0	2.6 \pm 1.0
22:2n6	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.2	0.0 \pm 0.1	0.1 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.1	0.0 \pm 0.1	0.1 \pm 0.2	0.1 \pm 0.2
22:4n6	0.4 \pm 0.3	0.3 \pm 0.3	0.2 \pm 0.2	0.1 \pm 0.2	0.0 \pm 0.1	0.0 \pm 0.1	0.4 \pm 0.3	0.3 \pm 0.2	0.3 \pm 0.5	0.3 \pm 0.5	0.2 \pm 0.3	0.2 \pm 0.3
22:5n6	1.0 \pm 0.3	1.1 \pm 0.3	1.2 \pm 0.5	1.4 \pm 0.4	1.8 \pm 0.5	2.2 \pm 0.7	0.8 \pm 0.4	0.7 \pm 0.2	1.5 \pm 0.6	1.5 \pm 0.6	1.4 \pm 0.6	1.4 \pm 0.6
UFA	23.2 \pm 6.0	24.0 \pm 5.7	25.8 \pm 7.0	24.9 \pm 5.3	27.6 \pm 7.4	29.3 \pm 7.0	16.5 \pm 7.4	13.4 \pm 5.7	23.4 \pm 7.4	23.4 \pm 7.4	21.5 \pm 5.9	21.5 \pm 5.9
UFA	7.5 \pm 1.9	7.1 \pm 1.8	6.5 \pm 1.6	6.8 \pm 1.0	6.4 \pm 1.4	7.7 \pm 2.1	6.5 \pm 2.4	4.1 \pm 1.3	6.4 \pm 1.9	6.4 \pm 1.9	6.2 \pm 1.7	6.2 \pm 1.7
PUFA	30.7 \pm 7.6	31.1 \pm 7.4	32.2 \pm 8.3	30.8 \pm 5.8	34.1 \pm 8.1	37.0 \pm 8.5	22.0 \pm 9.6	17.4 \pm 6.9	29.8 \pm 8.9	29.8 \pm 8.9	27.6 \pm 7.4	27.6 \pm 7.4

SFA: Saturated fatty acids; MUFA: Monounsaturated fatty acids; PUFA: Polyunsaturated fatty acids; EPA: Eicosapentaenoic acid; DHA: Docosahexaenoic acid; AA: Arachidonic acid; u3: Omega-3 fatty acids; u6: Omega-6 fatty acids

CHAPITRE 6. COMPÉTITION TROPHIQUE ET CHANGEMENTS ALIMENTAIRES ONTOGÉNIQUES CHEZ LES THONS TROPICAUX

Table 6.2: ANOVA and PERMANOVA results of tests for differences in total lipid content (TLC, % dw), fatty acid profiles (neutral lipids as a % of total fatty acids), and nitrogen and carbon isotope values ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, ‰) in the muscle and liver of tropical tuna. Tested factors are season (NEM, SWM, SIM, AIM), area (WCIO or MOZ), size class (FL<100 cm or FL>100 cm), species (SKJ, YFT and BET) and their interactions when possible. NEM: North-Eastern Monsoon; SWM: South Western Monsoon; SIM: Spring Inter-Monsoon; AIM: Autumn Inter-Monsoon; WCIO: Western-Central Indian Ocean; MOZ: Mozambique channel; BET: Bigeye; SKJ: Skipjack; YFT: Yellowfin. df: freedom degree; sqs: squares, F and Pseudo F: statistics of the tests.

Tissue	Factors	TLC					FATTY ACIDS					$\delta^{15}\text{N}$					$\delta^{13}\text{C}$				
		df	Sums of sqs	Mean sqs	F	P-value	df	Sums of sqs	Mean sqs	Pseudo-F	P-value	df	Sums of sqs	Mean sqs	F	P-value	df	Sums of sqs	Mean sqs	F	P-value
Muscle	Season	3	16.2	5.4	1.1	0.333	3	0.30	0.10	2.43	0.006	3	106.5	35.5	56.8	0.000	3	1.0	0.3	4.9	0.003
	Area	1	1.5	1.5	0.3	0.568	1	0.13	0.13	3.20	0.021	1	150.3	150.3	240.3	0.000	1	0.0	0.0	0.0	0.877
	Size class	1	4.3	4.3	0.9	0.342	1	0.51	0.51	12.37	0.001	1	32.2	32.2	51.5	0.000	1	2.8	2.8	40.2	0.000
	Species	2	3.2	1.6	0.3	0.715	2	0.49	0.24	5.84	0.001	2	79.5	39.7	63.6	0.000	2	3.3	1.6	23.2	0.000
	Size class * Species	1	14.7	14.7	3.1	0.079	1	0.09	0.09	2.25	0.043	1	0.7	0.7	1.1	0.296	1	0.1	0.1	1.2	0.276
	Size class * Area	1	60.9	60.9	12.9	0.000	1	0.07	0.07	1.78	0.120	1	1.7	1.7	2.7	0.103	1	0.5	0.5	6.4	0.012
	Species * Area	2	15.2	7.6	1.6	0.201	2	0.22	0.11	2.66	0.011	2	6.5	3.2	5.2	0.006	2	0.0	0.0	0.3	0.735
	Residuals	254	1198.9	4.7			176	7.32	0.04	0.80		242	151.4	0.6			242	17.0	0.1		
	Season	3	1101.5	367.2	7.8	0.000	3	0.30	0.10	2.85	0.006	3	159.5	53.2	139.0	0.000	3	1.1	0.4	2.5	0.050
	Area	1	199.8	199.8	4.2	0.041	1	0.19	0.19	5.28	0.002	1	109.5	109.5	286.2	0.000	1	1.2	1.2	8.1	0.005
Liver	Size class	1	2508.1	2508.1	53.0	0.000	1	1.27	1.27	35.70	0.001	1	0.0	0.0	0.1	0.760	1	5.3	5.3	34.8	0.000
	Species	2	230.4	115.2	2.4	0.090	2	0.54	0.27	7.56	0.001	2	53.9	26.9	70.4	0.000	2	0.5	0.2	1.5	0.215
	Size class * Species	1	153.6	153.6	3.2	0.073	1	0.03	0.03	0.97	0.334	1	3.0	3.0	7.7	0.006	1	0.0	0.0	0.2	0.646
	Size class * Area	1	689.0	689.0	14.6	0.000	1	0.22	0.22	6.31	0.002	1	0.0	0.0	0.0	0.849	1	0.4	0.4	2.4	0.121
	Species * Area	2	95.9	48.0	1.0	0.365	2	0.05	0.03	0.77	0.583	2	8.7	4.4	11.4	0.000	2	0.6	0.3	1.9	0.149
	Residuals	241	11407.1	47.3			168	5.97	0.04	0.70		227	86.8	0.4			227	34.4	0.2		

combined for BET and YFT, all $p < 0.05$). Those differences were mainly attributed to 18:1 ω 9, 18:1 ω 7 and 20:1 ω 9 (Table 6.1). Overall, SFA were in comparable proportions among species, despite some specific differences in liver (e.g. 16:0 was higher, $36 \pm 7\%$ in SKJ compared to $34 \pm 5\%$ in YFT and $31 \pm 5\%$ in BET small and large specimens combined for BET and YFT).

The influence of sampling area on tuna's NFA was highlighted by post-hoc Wilcoxon's tests, but different results were obtained for each tissue. Slightly higher proportions of SFA were found in muscle of tuna from WCIO ($47 \pm 9\%$) than those from MOZ ($44 \pm 9\%$; $W = 4043$, $P < 0.05$), while proportions of PUFA and MUFA were similar ($P = 0.15$ and $P = 0.10$). In tunas' liver, proportions of PUFA were higher in MOZ ($34 \pm 7\%$) than in WCIO ($28 \pm 10\%$; $W = 1927$, $P < 0.005$), mainly driven by changes in DHA ($W = 3714$, $P < 0.01$) and not EPA ($P = 0.09$), the second most relevant PUFA. In contrast, MUFA were higher in WCIO ($25 \pm 11\%$) than in MOZ ($20 \pm 8\%$; $W = 3765$, $P < 0.005$) while proportions of SFA were the same ($P = 0.718$). Seasonal effects were observed in tunas' liver due to variations in ω 6 proportions between SIM ($7 \pm 2\%$) and SWM ($6 \pm 2\%$; $P < 0.01$) and in EPA proportions between AIM ($6 \pm 2\%$) and NEM ($5 \pm 2\%$; $P < 0.05$). Seasonal effects were also observed in tunas' muscle largely due to differences in MUFA proportions between SIM ($22 \pm 6\%$) and NEM ($18 \pm 7\%$; $P < 0.01$).

Several interactions among factors influenced tissue NFA profiles. In liver, only an interaction between size class and area was detected (Table 6.2). Thus, large YFT in the WCIO had significantly different liver NFA profiles than similar sized YFT in the MOZ (PERMANOVA, Pseudo-F=16.9, $P < 0.001$), with on average 14% more MUFA than YFT from MOZ ($W = 20$, $P < 0.005$), mainly attributed to 18:1 ω 9 (12% more; $W = 18$, $P < 0.005$), but on average 15% less PUFA ($W = 137$, $P < 0.001$). In contrast, in the liver of small tuna almost no differences between areas were detected: only ω 6-PUFA family was found higher of 1% in MOZ (MOZ: $8 \pm 1\%$, WCIO: $7 \pm 1\%$; $W = 2096$, $P < 0.001$).

In muscle, inter-specific size-relevant differences from both areas were detected. In small tuna from WCIO, higher proportions of MUFA were reported in BET compared to YFT (mean difference of 5%, $P < 0.05$) and SKJ (mean difference of 9%, $P < 0.001$). Such differences were mainly attributed to 18:1 ω 9 ($P < 0.001$). No significant inter-specific differences were detected among small tuna for PUFA, ω 3- and ω 6-PUFA families, however there were significantly higher contributions of EPA, DHA, AA, and 22:5 ω 6 observed in SKJ compared to both YFT and BET ($P < 0.05$) which showed similar profiles. Only one SFA, 18:0, was found to differ among muscle of small tunas, with lowest proportions found in BET (12% of total NFA) than in SKJ (14%, $P < 0.05$) and YFT (14%, $P < 0.05$). For large tunas in the WCIO, no differences in NFA profiles were noted among species (PERMANOVA, Pseudo-F=1.0, $P = 0.36$): only 18:3 ω 3 was found to differ inter-specifically in the muscle (Table 6.1). Similar inter-specific size-comparable differences were also detected among tuna sampled in the MOZ, with lower proportions of PUFA recorded in BET muscle compared to SKJ (mean difference of 14%, $P < 0.001$) and YFT (mean difference of 8%, $P < 0.005$), the highest proportions being measured in SKJ muscle (e.g. DHA on average 8% and 5.4% lower in BET than SKJ and YFT respectively). The highest MUFA proportions were observed in BET and the lowest in SKJ, mainly attributed to the 18:1 ω 9, on average 5% higher in BET than in SKJ for muscle ($P < 0.05$).

Stable isotope signatures

$\delta^{13}\text{C}$ values varied with area and size class in liver and by size class, species and season in muscle, and $\delta^{15}\text{N}$ values significantly varied with area, season, species and size class and according to a species-area interaction in both tissues, and a size class-species interaction in liver (Table 6.2).

Muscle $\delta^{13}\text{C}$ values were slightly lower during NEM than AIM and SWM ($P < 0.05$) but no difference was

CHAPITRE 6. COMPÉTITION TROPHIQUE ET CHANGEMENTS ALIMENTAIRES ONTOGÉNIQUES CHEZ LES THONS TROPICAUX

observed in liver. $\delta^{15}\text{N}$ values in tuna muscle were significantly higher in WCIO ($12.2 \pm 0.9\text{‰}$) than in MOZ ($10.2 \pm 1.3\text{‰}$, $P < 0.001$), with a similar trend displayed in the liver (WCIO: $11.4 \pm 0.7\text{‰}$; MOZ: $9.3 \pm 1.2\text{‰}$, $P < 0.001$). $\delta^{15}\text{N}$ values in both tissues were lower during SIM than the other seasons (i.e. in liver: mean 1.9‰ less than AIM, 1.8‰ less than NEM and 1.6‰ less than SWM, $P < 0.001$; and in muscle: mean 1.3‰ less than AIM, 1.0‰ less than NEM and 1.5‰ less than SWM, $P < 0.001$).

Size-class differences were reported for both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values in muscle with higher values reported in large tuna in comparison to small tuna (mean difference of 0.8‰ and 0.2‰ respectively, $P < 0.001$). In liver, $\delta^{13}\text{C}$ values were significantly higher in large tuna than in small tuna (mean difference of 0.3‰ , $P < 0.001$), but no difference in $\delta^{15}\text{N}$ values was observed ($P = 0.784$).

Inter-specific size-comparable differences from the WCIO were found using post-hoc Tukey HSD comparisons. In small tuna, $\delta^{13}\text{C}$ values were slightly lower in BET compared to YFT and SKJ in muscle (mean difference of 0.2‰ , $P < 0.01$), while no inter-specific differences were detected in liver (both $P > 0.1$). In contrast, $\delta^{15}\text{N}$ values were significantly higher in BET, closely followed by YFT, and finally SKJ in both tissues (Table 6.1), with mean differences among species ranging from 0.3 to 1.1‰ ($P < 0.05$, except between BET and YFT in muscle: $P = 0.12$). In large tuna, significantly lower $\delta^{13}\text{C}$ values were found in BET muscle than YFT (on average 0.5‰ , $P < 0.001$), while the low differences (of 0.2‰) in liver were not significant ($P = 0.09$). BET presented significantly higher $\delta^{15}\text{N}$ values than YFT for both tissues (on average 1‰ and 0.8‰ , respectively, $P < 0.001$). In MOZ, $\delta^{13}\text{C}$ values were slightly lower in small BET compared to small YFT and SKJ, as in WCIO (Table 6.1; mean difference of 0.2‰ , $P < 0.05$). On the contrary, small BET had higher muscle $\delta^{15}\text{N}$ values (of 1.7‰) than YFT ($P < 0.005$) and SKJ ($P < 0.001$), while small YFT and SKJ exhibited similar muscle $\delta^{15}\text{N}$ values ($P = 0.986$). In liver, the highest $\delta^{15}\text{N}$ values were recorded for small BET followed by small YFT and finally SKJ, with mean differences ranging from 0.7 to 1.9‰ ($P < 0.05$). Post-hoc Tukey HSD comparisons revealed significantly lower $\delta^{15}\text{N}$ values in large YFT from MOZ than large YFT from WCIO in muscle and liver (mean difference of 2.3‰ , $P < 0.001$ and 1.9‰ ; $P < 0.001$, respectively). $\delta^{13}\text{C}$ values were also lower in muscle of large YFT from MOZ than from WCIO (mean difference of 0.3‰ , $P < 0.001$), while no difference was detected in liver ($P = 0.386$).

Biochemical trophic niche metrics

Trophic niche overlap based on SI (INes) and FA (FANes) was explored among the three tuna species differentiating patterns between tissues, size classes and sampling areas. Overall, index values showed less variation in liver (ranging from 0.30 to 0.81) than muscle (0.09 to 0.81 , Table 6.3). Although some differences were evident between INes and FANes, the degree of overlap among species agreed, with the lowest trophic space shared by BET and SKJ. According to these indices in both tissues of small tunas, and in particular muscle, SKJ and BET shared limited trophic space, whereas the highest niche overlap was between BET and YFT. Indeed, in muscle of small tuna sampled in the WCIO, the NFA niche volume defined for YFT overlapped with that of BET, while the niche area of SKJ differed mainly due to PUFA (Fig. 6.2a). A similar pattern was observed for INes in liver, with large overlap between YFT and BET (0.81) due to higher $\delta^{15}\text{N}$ values compared to SKJ (Fig. 6.3a). However, in muscle, the highest INes was observed between small YFT and SKJ (0.81).

In large tunas, FANes in both tissues showed quite large trophic overlaps between BET and YFT (Table 6.3; (Fig. 6.2b). On the contrary, differences in INes were apparent with no overlap of trophic space between large BET and YFT in muscle (INes= 0.0) and a limited overlap in liver (INes= 0.34) (Fig. 6.3b). In MOZ, SKJ and small YFT shared most of their trophic space, while small BET and small YFT shared

Area	Size class	Tissue	Groups	FANes (3D)	INes (2D)
WCIO	FL≤100cm	Muscle	BET, SKJ	0.12±0.07	0.09±0.03
			BET, YFT	0.62±0.08	0.37±0.03
			SKJ, YFT	0.07±0.10	0.81±0.05
		Liver	BET, SKJ	0.30±0.05	0.43±0.07
			BET, YFT	0.60±0.08	0.81±0.04
			SKJ, YFT	0.51±0.07	0.49±0.03
	FL>100cm	Muscle	BET, YFT	0.71±0.06	0.00±0.00
		Liver	BET, YFT	0.53±0.14	0.34±0.06
MOZ	all sizes	Muscle	BET, SKJ	0.06±0.08	0.10±0.02
			BET, YFT	0.29±0.13	0.36±0.06
			SKJ, YFT	0.41±0.07	0.63±0.05
		Liver	BET, SKJ	0.08±0.04	0.15±0.04
			BET, YFT	0.34±0.22	0.44±0.13
			SKJ, YFT	0.40±0.06	0.73±0.05

Table 6.3: Biochemical trophic niches indices (INes for stable isotopes and FANes for neutral fatty acids profiles) calculated for small (≤ 100 cm) and large tuna (> 100 cm), in Western-Central Indian Ocean (WCIO) and Mozambique Channel (MOZ) separately. Values correspond to the degree of overlap among species with 0 = no overlap and 1 = complete overlap. BET: Bigeye; SKJ: Skipjack; YFT: Yellowfin.

almost a third (with FANes and INes in both tissues ranging from 0.40 to 0.73 and 0.29 to 0.44, respectively, Table 6.3). In comparison, small BET and SKJ exhibited reduced overlaps according to both FANes and INes in both tissues.

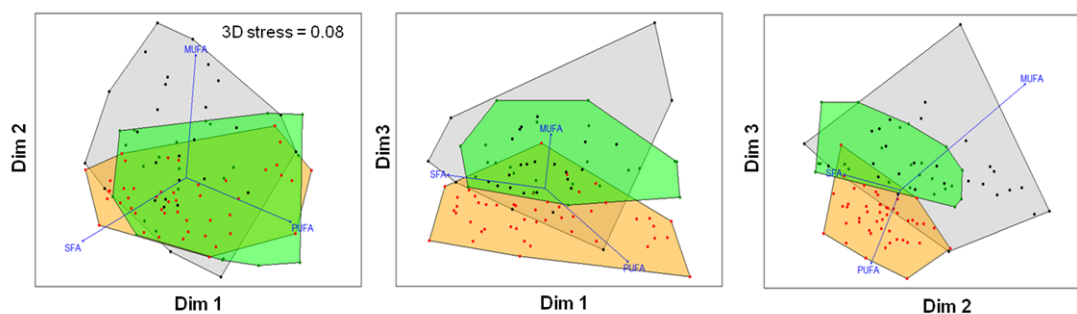
6.4.2 Intra-specific variability focusing on ontogenetic shifts

Bigeye tuna

GAM predicted TLC in BET remained constant in muscle (3 ± 2 % dw) while it increased in liver with size (by 5-10% dw between 29.5 and 160.8 cm FL), with no influence of other tested variables (Table 6.5). The dominance of the predicted proportions of MUFA and PUFA (predominantly represented by 18:1 ω 9 and DHA respectively) were reversed in liver at 91 cm FL with MUFA higher in larger individuals (Fig. 6.4a). Proportions of MUFA increased linearly with size, while PUFA proportions decreased (23.6% of deviance explained with size alone), mainly due to a decrease of DHA proportion in comparison to other essential NFA (Fig. 6.4b). No change was observed for SFA in liver, which remained the main NFA class throughout the BET size range. Finally, deviance explained for the main NFA families in BET muscle was poor (ranging from 5.3% for PUFA to 23.4% for MUFA), but there was also a slight increase of MUFA proportion with size. No influence of maturity was observed in NFA in both tissues (Table 6.6).

Predicted values of both isotopes were mainly affected by size and area in both BET tissues (Table 6.5). Season also influenced $\delta^{13}\text{C}$ values in both tissues, but no influence of sex or maturity on isotopic data was observed. No clear pattern with size was obtained for liver $\delta^{13}\text{C}$ values, with a mean increase by 0.9‰ between 30 and 76 cm FL before oscillating around -17.4 ± 0.5 ‰ until 160 cm FL. $\delta^{13}\text{C}$ values in muscle displayed the largest increase from 30 to 77 cm FL (0.5‰ on average) and then remained constant at -17 ± 0.1 ‰ until 160 cm FL. Liver $\delta^{15}\text{N}$ values slowly increased with BET size between 30 and 69 cm FL (i.e. mean increase of 0.6‰ in 39 cm), then remained stable until 160 cm FL (Fig. 6.5a). In muscle, the main variation of $\delta^{15}\text{N}$ was observed from 30 to 54 cm FL (i.e. mean increase of 1.8‰ at 24 cm), followed by relatively constant values until 140 cm and a slight increase between 140 and 160 cm (i.e. mean increase of 1.0‰ at 107 cm; Fig. 6.5b).

(a) WCIO – FL ≤ 100 cm



(b) WCIO – FL > 100 cm

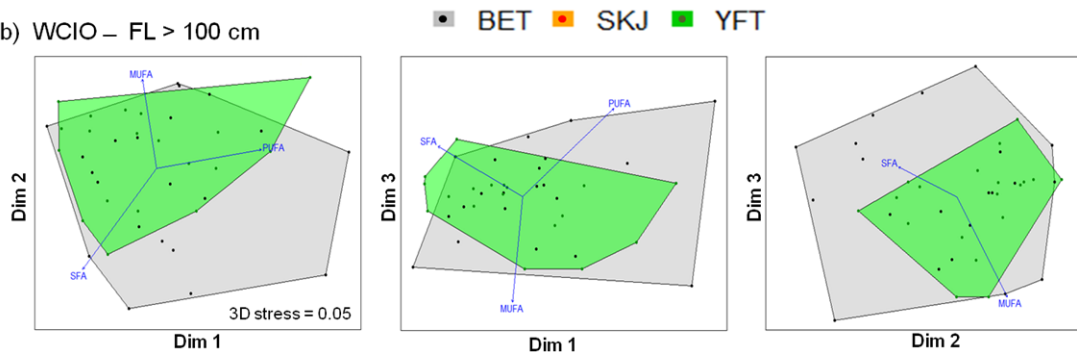


Fig. 6.2: Scatterplots and associated convex hull of three-dimensional nonmetric multidimensional scaling (NMDS) using Euclidean distance matrix for neutral fatty acid profiles in the muscle of skipjack tuna (SKJ), yellowfin tuna (YFT) and bigeye tuna (BET) caught in the Western-Central Indian Ocean (WCIO), according to size class: (a) fish with fork length less than 100 cm ($FL \leq 100$ cm) and (b) fish with fork length higher than 100 cm ($FL > 100$ cm). Arrows are significant variables ($P < 0.05$) correlated with the ordination. Dim: dimension.

Yellowfin tuna

TLC in YFT muscle and liver was affected by size (Table 6.5) but with unpredictable trends, and the fitted GAM performed poorly for muscle with only 11.6% of deviance explained. In liver, TLC oscillated with size, and male had a slightly higher TLC than female and indeterminate ($23 \pm 11\%$ vs. $15 \pm 8\%$, $P < 0.05$). NFA profiles were mainly affected by size. In liver, the mean proportions of MUFA and PUFA were reversed at 109 cm FL (Fig. 6.4a): MUFA increased by about 20% from 109 to 160 cm FL (from around 50% to 70%), when PUFA subsequently decreased (from around 55% to 35%). Size explained 36% of MUFA and 51.5% of PUFA variability in liver, but showed minor influence on SFA (Table 6.6b). Among PUFA, three essential NFA contribute strongly to the observed decrease with size in liver: DHA, EPA and AA (Fig. 6.4b). Although minor contributors, 18:3 ω 3 and 18:2 ω 6 also significantly decreased with size ($P < 0.0001$). In muscle, PUFA and SFA generally remained constant with size ($38 \pm 3\%$ and $44 \pm 5\%$, respectively). In contrast, size explained 58.4% of MUFA variability in muscle with proportions showing a progressive increase from $14 \pm 2\%$ at 32 cm FL to $29 \pm 2\%$ at 157 cm FL. Despite a maturity influence in NFA profiles of liver and muscle, no influence was then observed on the main NFA families (Table 6.6b). Isotopic compositions in both tissues were influenced by all tested variables, with the exception of sex. In liver, both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values slightly increased of around 0.5‰ from 29 to 157 cm FL (Fig. 6.5a). In muscle, minor variations of $\delta^{13}\text{C}$ values were observed over the range size ($< 0.6\%$), while $\delta^{15}\text{N}$ values strongly increased between 29 and 53 cm (from $10.7 \pm 0.3\%$

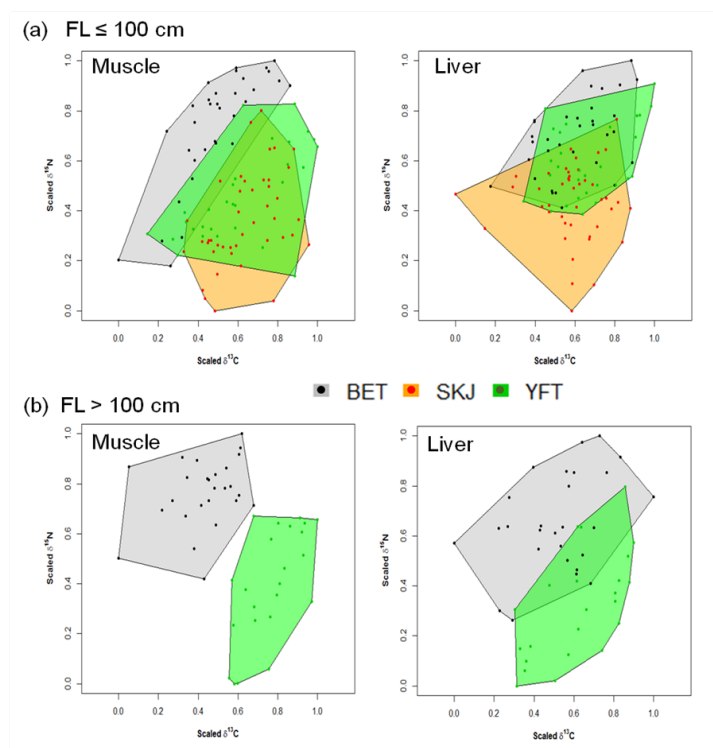


Fig. 6.3: Two-dimensional scaled isotopic space ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$) in the muscle and liver of skipjack tuna (SKJ), yellowfin tuna (YFT) and bigeye tuna (BET) caught in the Western-Central Indian Ocean (WCIO), according to size class: (a) fish with fork length less than 100 cm ($\text{FL} \leq 100$ cm), (b) fish fork length higher than 100 cm ($\text{FL} > 100$ cm).

to $12.9 \pm 0.3\text{‰}$), then progressively increased until 157 cm to reach $14 \pm 0.4\text{‰}$ (Fig. 6.5b). Muscle $\delta^{13}\text{C}$ values were also highest in YFT spawning ($-16.5 \pm 0.2\text{‰}$) compared to those developing ($-17 \pm 0.3\text{‰}$, $P < 0.001$).

Skipjack tuna

GAM predicted TLC was not affected by any of the tested variables in muscle of SKJ (Table 6.5) but varied with size in liver (min–max=2–30% dw), despite no obvious trend observed. In SKJ tissues, differences in NFA profiles were mainly attributed to sex and area, whereas size had no significant influence in muscle and a limited influence in liver (Table 6.6a). There was also no influence of maturity in both tissues (Table S3a). Wilcoxon tests revealed that the liver of females contained more SFA ($53 \pm 7\%$ vs. $46 \pm 7\%$; $W=218$, $P < 0.05$), mainly 16:0 ($W=238$, $P < 0.005$), and MUFA ($W=240$, $P < 0.005$) mainly 16:1 ω 7 ($W=250$, $P < 0.001$) and 18:1 ω 9 ($W=234$, $P < 0.01$), than males (Table 6.7). In contrast, liver of males had higher relative amounts of essential NFA 20:5 ω 3 (EPA), 22:6 ω 3 (DHA) and 20:4 ω 6 (AA) (all $P < 0.01$; Table 6.7) than females: mean differences between males and females ranged from 1% for 22:5 ω 6 to 8% for DHA (Table 6.7). PUFA proportion in liver was higher in male and indeterminate ($W=201$, $P < 0.05$) than in female ($W=173$, $P < 0.001$, Table 6.7).

In contrast, no differences in isotopic compositions were observed between genders in both tissues (Table 6.7). No clear trend was observed for $\delta^{13}\text{C}$ values which remains overall constant (around -17.5‰ in liver and -17‰ in muscle), whereas $\delta^{15}\text{N}$ values increased by 2.0‰ in muscle from 7.7‰ , and 1.1‰ in liver from 7.1‰ between 30 and 78 cm FL (Fig. 6.5). For both isotopic values in both tissues, no influence of maturity was noted (Table 6.5).

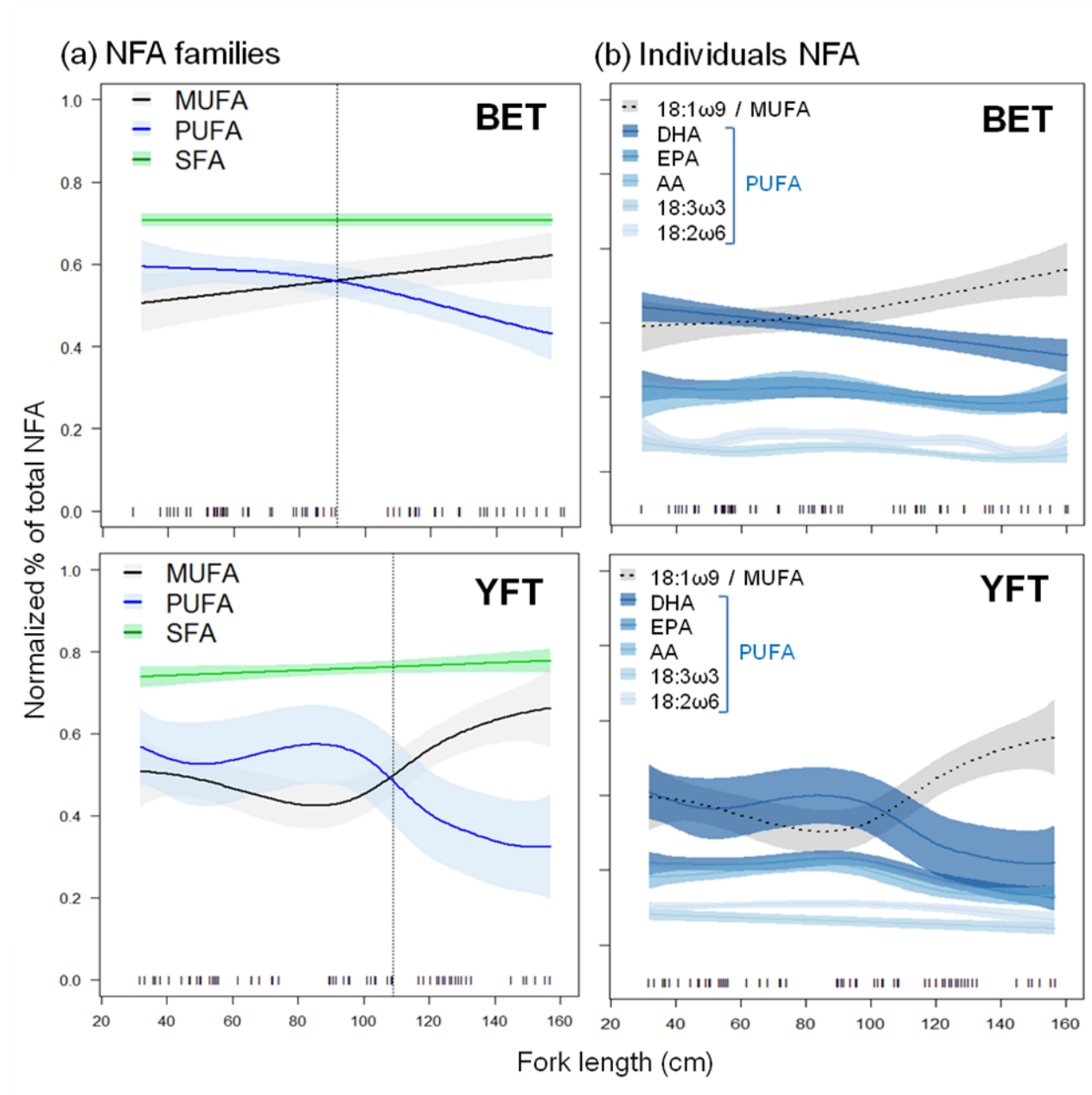


Fig. 6.4: Smoother plots illustrating the relationship between observed fork length (FL) and GAM predicted values for (a) the main fatty acid (FA) families (b) six individuals neutral fatty acid (NFA) in the liver of BET and YFT sampled in the Western-Central Indian Ocean throughout 2013. Vertical dashed lines represent the size at which a proportion change in the main FA families occurs (91 and 109 cm FL for BET and YFT respectively). Solid areas showed the confidence interval (1.96*standard error) around the predicted value (line). Short vertical lines on the x-axis represent the sampled values; BET: Bigeye; SKJ: Skipjack; YFT: Yellowfin; EPA: Eicosapentaenoic acid (20:5 ω 3); DHA: Docosahexaenoic acid (22:6 ω 3); AA: Arachidonic acid (20:4 ω 6).

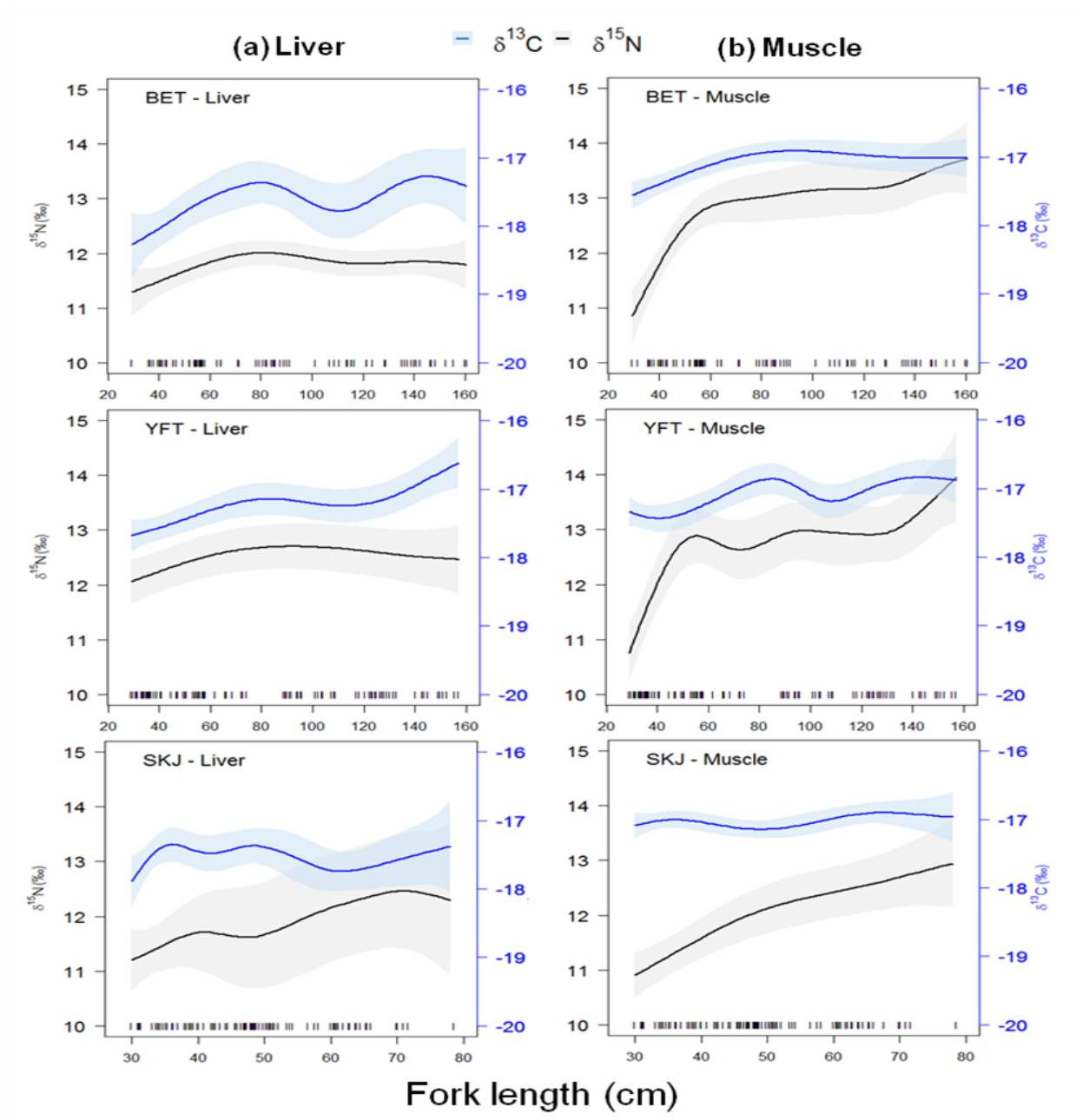


Fig. 6.5: Smoother plots illustrating the relationship between observed fork length (FL) and GAM predicted values for stable isotopes values ($\delta^{13}\text{C}$ in blue and $\delta^{15}\text{N}$ in black) in (a) liver and (b) muscle of bigeye (BET), yellowfin (YFT) and skipjack (SKJ) from Western-Central Indian Ocean. Solid areas showed the confidence interval ($1.96 \times \text{standard error}$) around the predicted value (line). Short vertical lines on the x-axis represent the sampled values.

6.5 Discussion

6.5.1 FA and SI compositions of tuna preys

Using complementary trophic tracers, this study provides greater understanding of trophic relationships and food partitioning among tropical tuna from the Western Indian Ocean. Due to their biological proximity and habitat sharing, overlaps in their trophic niches were detected, especially in NFA compositions of large individuals (Fig. 6.2b). However, significant inter- and intra-specific differences were also noticed: higher PUFA proportions in SKJ than in small BET and YFT (Fig. 6.2a); separated isotopic niches occupied by large YFT and BET (Fig. 6.3b); increased MUFA proportions with size in the liver of BET and YFT (Fig. 6.4), while a difference between sexes was observed only in SKJ (higher PUFA proportions in male). The origins of these differences are likely explained through comparison to the FA and SI compositions of their main preys. Only a few studies report NFA profiles for tuna prey in the Western Indian Ocean, but some information exists for other oceans. High MUFA proportions are characteristic of myctophids fishes (Saito and Murata, 1998), including in tropical waters (Sebastine et al., 2011; Baby et al., 2014), due to their high consumption of copepods rich in 20:1 MUFA (Saito and Kotani, 2000). Myctophids are small pelagic fishes, inhabiting deep layers (over 400 m) during the day and that migrate to surface layers (around 5-100 m) each night to feed (Vipin et al., 2012). The present study reported large MUFA proportions in the tissues of the larger tropical tunas (BET and YFT) which is likely associated to direct consumption of myctophids or indirect myctophids consumption passing through the digestive gland of various squids (Phillips et al., 2002; Pethybridge et al., 2013). Indeed, middle-sized squid *Sthenoteuthis oualaniensis*, a common tuna prey in the region under study (Ménard et al., 2013), ascends between the surface and 100 meters depth only at night to feed on myctophids (Shulman et al., 2002). However, the mantle of *S. oualaniensis* contains high proportions of DHA (Shulman et al., 2002) and PUFA (52% of total FA; Young et al., 2010a). Cigarfish *C. pauciradiatus* is another small fish prey rich in MUFA (Young et al., 2010a), on which YFT mainly forage during the NEM period in WCIO (Zudaire et al., 2015). Globally, less information is available concerning the FA profile of crustacean, including the swimming crab *Charybdis smithii* and the stomatopod *Natosquilla investigatoris*, that are also known prey of tropical tuna (Potier et al., 2004). In the Pacific Ocean a related crab species, *Charybdis hawaiiensis*, is reported to be mainly composed of PUFA (42% of total FA) (Piché et al., 2010). In addition, *C. smithii* come up in surface layers mainly at night in the Indian Ocean (Romanov et al., 2009), while *N. investigatoris* was occasionally found in surface layers at daytime (Losse and Merrett, 1971). Thus, the high proportions of PUFA in SKJ suggest a lower consumption of myctophids, squid consuming myctophids, and small fish in general, but a higher consumption of crustaceans. This was indeed observed in the stomach content analyses of SKJ in the Western Indian Ocean (Grande, 2013). By contrast, PUFA proportions in small BET and in YFT suggest a low consumption of crustaceans that seems to decrease with size with higher proportions of MUFA in large individuals (Fig. 6.5a).

In contrast to NFA profiles, isotopic data of the main tuna prey groups were available for the Western Indian Ocean, but more so for the Mozambique Channel. Squids and small fishes have been shown to occupy similar trophic levels with mean $\delta^{15}\text{N}$ values around $9.4 \pm 0.8\text{‰}$ and $9.5 \pm 1.6\text{‰}$, respectively, while crustaceans occupy a slightly lower trophic level with mean $\delta^{15}\text{N}$ values around $8.7 \pm 1.3\text{‰}$ (Ménard et al., 2014). However, a great variability was observed among the small fishes: cigarfish have lower mean $\delta^{15}\text{N}$ values ($9.0 \pm 2.2\text{‰}$) than most myctophids such as *Diaphus metopoclampus* with the higher $\delta^{15}\text{N}$ values ($12.2 \pm 0.4\text{‰}$) but the lower $\delta^{13}\text{C}$ values ($-19.3 \pm 0.2\text{‰}$; Ménard et al., 2014). The particular isotopic position of this myctophid might increase the isotopic position of large BET, which has higher $\delta^{15}\text{N}$ values and lower $\delta^{13}\text{C}$ values than

large YFT, in muscle and liver (Fig. 6.3b). $\delta^{15}\text{N}$ values of main tuna prey have also been shown to increase with size (in myctophids, the cigarfish and squid *S. Oualaniensis*; Parry, 2007; Ménard et al., 2014). However, limited variability in $\delta^{13}\text{C}$ values are displayed among tuna prey with mean values ranging from $-18.6 \pm 0.4\text{‰}$ in small fish to $-18.2 \pm 0.6\text{‰}$ in crustaceans. This suggests that any differences in $\delta^{13}\text{C}$ values in tuna from this area should be interpreted with caution.

6.5.2 Trophic partitioning in tuna aggregations

Total lipid content data suggests that none of the three tuna species appears to store lipid in muscle, as it remained low and did not vary with the considered factors. The liver showed more variability in TLC, which was mainly explained by season and size class differences. In the three species, fattest livers were sampled during the two monsoon periods, however modest seasonal differences were detected in SKJ. This could be related to a specific diet during monsoons, as YFT have been recorded to forage predominantly on fatty small fishes, such as *C. pauciradiatus* during NEM in the studied region (Zudaire et al., 2015).

Partial niche overlaps were observed in the liver of small tunas (Fig. 6.2a and Fig. 6.3a). As tunas still form multispecific schools, partial trophic sharing does not appear to reduce the advantages of schooling behavior (e.g. reduced predation, faster food detection; Pavlov and Kasumyan, 2000). When trophic niches are large (i.e., diet behaviors of individuals are diverse in each species), diet overlap among species does not really increase the competition intensity among them, because only a few individuals in each species are impacted: Bolnick et al. (2011) called this “niche complementarity”. This phenomenon might reduce predator-prey dependency and dampen consumers-resources oscillations (McCann et al., 1998), which may offer a long-term advantage in nutrient poor habitats such as tropical offshore waters. As these small tuna were caught under drifting fish aggregating devices (FADs), the use of which has recently intensified (Chassot et al., 2015) and is thought to act as an ecological trap (Hallier and Gaertner, 2008), the possibility that FADs promote competition among small tuna cannot be excluded.

Calculated FANes showed greater trophic overlap between YFT and BET than between YFT and SKJ, mainly based on differences in MUFA proportions, which suggested that SKJ consumes less small fishes. In addition, mean $\delta^{15}\text{N}$ values in both tissues were higher in small BET than small YFT and SKJ, suggesting predation on different prey sizes with small BET likely feeding on prey with higher trophic positions and of a larger size, as already observed by comparing the size of prey from stomach contents of YFT and BET (Ménard et al., 2006). Despite the importance of variation in the predator body size on trophic cascades (Rudolf, 2007), no studies have specifically focused on tuna prey size distribution in the Indian Ocean, however, Potier et al. (2008) noticed that surface YFT fed more on smaller cigarfish than sub-surface YFT. On the other hand, diving capacities differences among small tuna (further discussed in section 6.5.1) also suggest the possibility of vertical sharing in mixed schools of small tuna.

In large tuna, only minor differences in the proportions of individual NFA were observed (Table 6.1). This suggests that the two species feed on similar proportions of the same prey species, which is in agreement with stomach content analyses of large tuna caught by purse-seine (Potier et al., 2004). However, the stable isotope compositions were different between these two species and suggested a higher trophic level in BET than in YFT (Fig. 6.3b). As mentioned for small tuna, differences in prey size could explain differences in $\delta^{15}\text{N}$ values between large tuna. These results align with stomach content data from the same area, which showed that squid and cigarfish individuals were larger in the stomachs of BET than similar sized YFT (Potier et al., 2008; Ménard et al., 2013). As indicated by differences in $\delta^{13}\text{C}$ values, we suspect that BET feed, directly or indirectly (i.e., through squids), on specific myctophids, such as *D. metopoclampus*, with lower $\delta^{13}\text{C}$ values.

CHAPITRE 6. COMPÉTITION TROPHIQUE ET CHANGEMENTS ALIMENTAIRES ONTOGÉNIQUES CHEZ LES THONS TROPICAUX

Indeed, large BET in deeper water layers have been found to feed more on squids than similar sized YFT (Potier et al., 2008). Thus, despite large BET and YFT co-occurring and focusing on similar prey groups in surface waters when caught by purse-seine, in long-term (as integration times of trophic tracers used in the present study approach several months; Budge et al., 2011; Madigan et al., 2012), a specific orientation based on prey size and/or specific myctophids predators could limit their competition. In addition, the same inter-specific differences in isotopic compositions were observed in both tissues with different integration time (Fig. 6.3a). This suggests that the aggregations of large individuals in mixed schools are not durable at the scale of isotopic turnover rates (around 6 months in muscle and 3 in liver; Madigan et al., 2012).

As noticed by Young et al. (2010b) in the Pacific Ocean for large individuals, diet differences reflect diel variations in foraging among tuna, with large BET thought to feed more at night than YFT, when myctophids and squids ascend from deeper layers (see section 6.5.1). In contrast, SKJ feed mainly during the day, but night foraging has been reported (Romanov et al., 2009; Grande, 2013). Such diel foraging behaviors may be reflected in the biochemical signatures and suggest limited tuna competition. Indeed, considering the main tuna prey, myctophids, squids and the crab *C. smithii* come up in surface layers mainly at night in the Indian Ocean), whereas the stomatopod, *N. investigatoris*, could be found in surface layers at daytime (see section 6.5.1) and in stomach content of surface tuna in Indian Ocean (Potier et al., 2008; Grande, 2013). Thus, a myctophid dominant diet, as observed in BET, is probably more related to nocturnal feeding.

Environmental variables (i.e. fishing area and season) influenced trophic tracers in both tissues, attesting to their non-negligible impacts on tuna diet. For example, the cigarfish constitutes most of the tuna diet in the Indian Ocean especially during NEM (Fonteneau et al., 2008; Potier et al., 2008) and appears to be an important energy source in the reproduction of YFT (Zudaire et al., 2015).

Lower $\delta^{15}\text{N}$ values were found in tuna from MOZ, as reported in previous studies (Ménard et al., 2007a; Zudaire et al., 2015). This is generally attributed to a lower base line in Mozambique Channel (Ménard et al., 2007a), due to diazotrophic organisms that lower the $\delta^{15}\text{N}$ value of particulate organic matter (Dupuy et al., 2016). An influence on NFA profiles was also possible, as diatoms, with high EPA biosynthesis capacities, have been shown to predominate in mesoscale eddies (e.g. Brown et al. (2008) in subtropical Pacific), which are abundant in MOZ (Potier et al., 2014). In contrast, higher proportions of DHA, characteristic of dinoflagellates, were found in liver of tuna from MOZ, suggesting a more complex response to mixing events, and overall a mixing signal through multiple trophic levels from phytoplankton to higher trophic levels (Kainz et al., 2004).

6.5.3 Diet changes during tuna ontogeny

Patterns observed in each tuna species were slightly different, probably related to physiological differences. For the three species, the liver was found to be more informative than the white muscle to detect intra-specific changes, as it is a reactive tissue to rapid diet changes in relation with fast turnover rate (Logan et al., 2006). In addition, TLC was relatively lower in white muscle than in liver, attesting to the known role of liver in energy storage. Therefore, NFA profiles in muscle appear to be less informative for ontogenetic studies in leaner fish such as these tropical tunas. By contrast, NFA profiles in liver were found to be of valuable interest when examining dietary changes with size.

In both BET and YFT, PUFA proportion decreased in liver with size while MUFA concurrently increased (at around 91 and 109 cm in BET and YFT; Fig. 6.4a). In contrast, no changes were observed with size in SKJ, but differences between gender were noticed, especially in liver, with higher PUFA proportion in male (Table 6.7). Two main hypotheses could support differences among the tuna species: a biological

process response (e.g. reproduction) and/or a change of habitat (e.g. from surface to deeper layers). First, concerning reproduction, the size at which 50% of the population matures was estimated at 100 cm FL for BET in the Pacific ocean (Farley et al., 2006), 75 cm for YFT (Zudaire et al., 2013a) and 39 cm for SKJ (Grande et al., 2014), both from the Western Indian Ocean. Thereby, PUFA of mature fish would be allocated to germinal cell production, especially in females. Indeed, vitellogenin synthesis in ovary has been shown to require higher quantities of PUFA, especially in EPA and DHA (Silversand and Haux, 1995). However, no significant influence of maturity on the proportions of the main NFA classes was detected in this study. The influence of reproduction on NFA profiles is however more likely in SKJ, as it has been shown to be an income-breeder species, i.e. which reinvest the majority of its acquired energy to reproduction, and breeding all year round (Grande et al., 2014). This suggests that in females, PUFA from liver are rapidly allocated to the ovary after acquisition; while males have fewer PUFA requirements and can store them into the liver explaining the higher proportion of PUFA in males than in females SKJ observed in the present study, and, potentially explaining higher TLC in liver of males. In the same way, in liver, PUFA proportion was found to be higher in indeterminates (i.e. the smaller fishes) than in females (Table 6.7). Indeed, according to this assumption, PUFA would be allocated to the gonads. These differences between sexes could also make females SKJ more sensitive to environmental changes, especially if there are less available dietary essential PUFA, as predicted for the south west Pacific Ocean (Pethybridge et al., 2015a).

Concerning habitat usage, the shift in main NFA families in BET and YFT could correspond to a habitat change for deeper environments providing rich-MUFA preys as myctophids or the myctophids-predators squids, which inhabit deeper layers (see section 6.5.1). Indeed, this shift could correspond to the sufficient development of the swim bladder and regional endothermy (Graham and Dickson, 2004), allowing BET and YFT to reach deeper layers with size, while SKJ does not have a swim bladder. Magnuson (1973) observed an allometric growth of swim bladder for YFT until 8-10 kg, corresponding approximately to a 70-75 cm FL fish. Bertrand and Josse (2000), who observed larger swim bladder in BET than in YFT at similar size, observed also an increase in the swim bladder volume over 120 cm FL. This would suggest that BET could reach deeper layers at smaller size than YFT, as emphasized with the earlier diet shift in NFA profile observed in BET than in YFT (i.e. 91 vs. 109 cm FL).

$\delta^{15}\text{N}$ values should be interpreted in context of specific differences in amino acids composition that are nitrogen compounds (i.e. slow turnover of essential amino acids; Popp et al., 2007), the tissue growth and the turnover rate (Martinez del Rio et al., 2009). Indeed, the fast increase with size of $\delta^{15}\text{N}$ values in muscle of the three species highlighted the influence of metabolic process and the importance of selected tissue for the trophic level estimation in food webs studies. In juvenile bluefin tuna, *T. orientalis*, Madigan et al. (2012) showed that the half-lives of ^{15}N in white muscle and liver were 167 and 86 days respectively, and 255 and 162 days for ^{13}C , respectively, highlighting influences of turn-over on isotopic composition. In addition, in different marine fish, a growth rate increase promotes a decrease of $\delta^{15}\text{N}$ values in muscle, and high metabolic levels promote a faster equilibration with diet (Trueman et al., 2005).

In both tissues, an increase in $\delta^{15}\text{N}$ values with size was observed in the three species with a strongest signal in muscle (Fig. 6.5). This increase could be linked to slowdown in growth rate and/or to an increase of prey size. Indeed, tropical tunas are opportunistic species and the mean size of their prey increased with tuna size (Ménard et al., 2006; Jaquemet et al., 2011), besides, $\delta^{15}\text{N}$ values of prey also increase with prey size (Ménard et al., 2014). In the three species, limited variations of $\delta^{13}\text{C}$ values in muscle indicated no change of carbon sources through life cycle. However, $\delta^{13}\text{C}$ values in liver were more difficult to interpret due to irregular variations, which could be related to metabolic activities as previously mentioned. Finally,

in BET and YFT, no breakpoints in isotopic values matched specific maturity or growth events, although Zudaire et al. (2015) observed higher $\delta^{15}\text{N}$ values in liver of spawning YFT.

6.5.4 Conclusion

This study provides a greater understanding of trophic interactions among and within three prominent tropical tuna species. We found that there is a resource partitioning among sympatric tuna and particularly among tuna ≤ 100 cm FL. Based on the biochemical tracers, we show evidence of ontogenetic dietary shifts in the larger tuna species (i.e. BET and YFT). Generally, larger tuna individuals were shown to have higher $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values than smaller individuals, suggesting higher trophic positions for the larger individuals and a more oceanic food source, and higher proportions of MUFA commonly high in myctophids fish and squid. Future work should focus on reporting of NFA profiles for potential prey in the Western Indian Ocean that to date was particularly scarce of such data, and detailing specific turnover rates of tissues and compounds (SI as NFA).

Acknowledgements

We are grateful to Hervé Guillou, Laurent Debrauwer, Marie Tremblay-Franco and Arnaud Polizzi (UMR TOXALIM, Toulouse) for assistance in lipids analyses, and to Sébastien Villéger (UMR MARBEC, Montpellier) for discussion about trophic niche metrics. We wish also to thank all the SFA lab technicians and IOT Ltd staff for their help throughout the tuna sampling, as well as the IRD/SFA/IEO samplers and the fishermen for their help onboard of purse-seiners. We thank two anonymous reviewers for their multiples comments and suggestions that greatly improved the manuscript. This work is a contribution to the projects EMOTION, CANAL, and ALECAP, respectively founded by ANR (ANR 11 JSV7 007 01), MWBrands, and France Filière Pêche.

6.6 Supplementary Material

Material and Methods: Trophic tracer analyses

Total lipid content determination and stable isotope analysis

A total of 520 samples (251 livers and 269 muscles) were analyzed for total lipid content, and carbon and nitrogen stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$). All samples were freeze-dried and ground up to a fine homogeneous powder with a ball mill MM200 (Retsch). To determine total lipid content, about 350 ± 100 mg of each powdered and dried sample was weighed balance to the nearest 0.1 mg and extracted with 8 ml of dichloromethane at 100°C under 1900 psi for 10 minutes using a Dionex ASE 200 Accelerated Solvent Extractor. The extracts were evaporated to dryness using a N-Evap 111 extractor (OA-SYS) and residues were weighed on an Adventurer Pro (OHAUS) analytical balance to the nearest 0.1 mg to determine the total lipid content (TLC) of the samples, expressed in % of dry weight (dw). Carbon and nitrogen stable isotopes were analyzed together on dried lipid-free samples (Bodin et al., 2009; Sardenne et al., 2015b). Approximately 0.4 ± 0.1 mg of each dried lipid-free sample was packed into 8×5 mm² pressed tin capsules (Sylab). Isotopic ratios were determined on a Delta V Advantage isotope ratio mass spectrometer interfaced to a Flash EA

1112 elemental analyzer with a ConFlo IV interface (EA-IRMS, Thermo Scientific) at the LIENSs stable isotope facility at the University of La Rochelle, France. Results are reported in the δ unit notation and expressed as per mil (‰) relatively to international standards (Vienna-Pee Dee Belemnite for carbon and atmospheric N₂ for nitrogen) following the formula:

$\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N} = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}}) - 1] \times 10^3$, where R is $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ or $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, respectively. Calibration was done using reference materials (USGS-24, IAEA-CH6, -600 for carbon; IAEA-N₂, -NO₃⁻, -600 for nitrogen). Analytical precision for both $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ was <0.15‰ based on replicate measurements of internal laboratory standard (acetanilide and peptone, Thermo Scientific).

The extent of chemical extraction was checked through the C:N ratio: 29 liver samples showed C:N ratios > 4 and were considered still fatty (McConnaughey and McRoy, 1979). These samples were submitted to a second ASE extraction and EA-IRMS analysis as described above to prevent for any possible leftover lipids. The final $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values obtained were considered as lipid-free results.

Neutral fatty acid analysis

A total of 367 samples (180 livers and 187 muscles) were selected for the analysis of neutral fatty acids (NFA). Approximately 100 ± 0.1 mg ww of each tissue was weighed, crushed with 1 ml of methanol:EGTA (5 mM) (2/1, v/v) using a FastPrep System® (MP Biomedicals) and extracted with 2 ml of dichloromethane:methanol (2:1, v/v) according to Folch et al. (1957). Indeed, dichloromethane can replace chloroform to avoid health and security problems (Cequier-Sánchez et al., 2008). After addition of 1 ml of aqueous KCl (0.9% w/v), the extract was further vortexed and centrifuged at 500 G for 10 min, allowing for the recovery of total lipids from the lower organic phase. Neutral lipids were isolated from the total lipid extract by solid-phase extraction using unmodified silica column (Chromabond®, Macherey-Nagel). Approximately 100 µl of extract were deposited on the column and the neutral lipids were eluted with 2 ml of dichloromethane:methanol (98:2, v/v). After hydrolysis in KOH-methanol (0.5 M) for 30 min at 56°C, NFA were transmethylated for 60 min at 80°C after adding 1ml of BF₃-Methanol 10% wt (Metcalf and Schmitz, 1961). Finally, neutral fatty acid methyl esters were analyzed on a TRACE 1310 gas chromatograph equipped with an on-column injector and a flame-ionization detector (GC-FID, Thermo Scientific) at the analytical platform MetaToul-AXIOM in Toulouse, France. Compounds were separated on a FAMEWAXTM column (30 m, 0.32 mm internal diameter, Restek) using helium as carrier gas at a constant flow of 15 ml.min⁻¹. The injector temperature was set at 225°C and the oven temperature was programmed from 130°C to 245°C at 2°C.min⁻¹ after a stationary phase at 130°C for 1 min. Peaks were identified by comparing sample retention times to those of commercial standard mixtures (Menhaden oil and Food Industry FAME Mix, Restek) with Xcalibur 2.2 software. NFA results were expressed in % as a relative abundance of total identified compounds.

CHAPITRE 6. COMPÉTITION TROPHIQUE ET CHANGEMENTS ALIMENTAIRES ONTOGÉNIQUES CHEZ LES THONS TROPICAUX

Table 6.4: Number of tuna individuals (n) analyzed for stable isotopes and neutral fatty acid, in each group (size class, sex, season, area and maturity). BET: Bigeye; SKJ: Skipjack; YFT: Yellowfin; I: indeterminate; F: female; M: male; AIM: Autumn Inter-Monsoon; NEM: North-Eastern Monsoon; SIM: Spring Inter-Monsoon; SWM: South Western Monsoon; WCIO: Western-Central Indian Ocean; MOZ: Mozambique Channel; Dev.: Developing phase; Spa.: Spawning capable phase.

Size range (cm)		BET		YFT		SKJ	
		29.5-160.8		29.0-157.0		30.0-78.5	
		SI	NFA	SI	NFA	SI	NFA
n total		81	61	94	59	94	69
Size class	≤ 100 cm	53	37	62	32	94	69
	> 100 cm	28	24	32	27	—	—
Sex	I	31	17	43	18	21	11
	F	25	23	21	21	36	30
	M	25	21	30	20	38	28
Season	AIM	3	3	2	2	6	4
	NEM	30	22	21	5	28	20
	SIM	23	18	32	22	34	24
	SWM	25	18	39	30	26	21
Area	WCIO	60	50	53	42	53	47
	MOZ	21	11	41	17	41	22
Maturity	Dev.	55	39	71	40	47	33
	Spa.	26	22	23	19	47	36

Table 6.5: Statistics of F-test for each species and tissue of generalized additive models selected by Akaike Information Criterion (AIC) on isotopic values of nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) and carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and total lipid content (TLC). BET: Bigeye; SKJ: Skipjack; YFT: Yellowfin; Y: Variable to explain; df: degree of freedom; edf: estimated degree of freedom for smoothed terms expressed as s(). Significant influences of terms are in bold.

Species	tissue	Y	Selected model	AIC	Deviance explained (%)	F-test			
						Terms	df/edf	F	P-value
BET	Muscle	$\delta^{15}\text{N}$	Y ~ Area + s(Size)	96.7	82.9	Area	1	37	0.000
						s(Size)	5	28.1	0.000
		$\delta^{13}\text{C}$	Y ~ Season + Area + Maturity + s(Size)	-5.6	44.7	Season	3	5.7	0.001
						Area	1	6.9	0.010
						Maturity	1	0	0.909
						s(Size)	3.1	7.2	0.000
	TLC		Y ~ s(Size)	278.9	9.51	s(Size)	5.1	1.548	0.197
	Liver	$\delta^{15}\text{N}$	Y ~ Season + Area + Sex + s(Size)	91.5	77	Season	3	12.1	0.000
						Area	1	22.3	0.000
						Sex	2	2.1	0.134
						s(Size)	7.1	2.9	0.008
		$\delta^{13}\text{C}$	Y ~ Season + Area + Maturity + s(Size)	81.4	42.5	Season	3	4	0.011
						Area	1	7.6	0.008
SKJ	Muscle					Maturity	1	0.4	0.526
						s(Size)	5.2	4.2	0.001
	TLC		Y ~ Area + s(Size)	507.3	34.6	Area	1	2.6	0.112
						s(Size)	5.7	3.1	0.008
	Liver	$\delta^{15}\text{N}$	Y ~ Season + Area + Maturity + s(Size)	155.2	75.2	Season	3	9.2	0.000
						Area	1	84.8	0.000
						Maturity	1	2.5	0.118
						s(Size)	2.2	12.4	0.000
		$\delta^{13}\text{C}$	Y ~ Season + s(Size)	-4.0	29.1	Season	3	4.4	0.006
						s(Size)	4.2	2.5	0.039
YFT	Muscle	TLC	Y ~ Sex	436.6	4.9	Sex	2	2.3	0.103
		$\delta^{15}\text{N}$	Y ~ Season + Area + Sex + s(Size)	161.1	79.6	Season	3	11.2	0.000
						Area	1	55.3	0.000
						Sex	2	1.4	0.251
						s(Size)	4	2.3	0.057
		$\delta^{13}\text{C}$	Y ~ Season + Area	58.3	21.7	Season	3	3.5	0.021
	Liver					Area	1	17.6	0.000
		TLC	Y ~ Sex + s(Size)	525.0	32.1	Sex	2	2.7	0.073
						s(Size)	8.2	2.9	0.006
		$\delta^{15}\text{N}$	Y ~ Season + Area + Maturity + s(Size)	172.3	86.2	Season	3	14.8	0.000
						Area	1	60.4	0.000
						Maturity	1	1.9	0.167
YFT	Muscle					s(Size)	6.1	15.6	0.000
		$\delta^{13}\text{C}$	Y ~ Season + Area + Maturity + s(Size)	1.2	60	Season	3	1.9	0.135
						Area	1	10.1	0.002
						Maturity	1	7.3	0.008
						s(Size)	6.5	5.5	0.000
	TLC		Y ~ Area + s(Size)	431.8	11.6	Area	1	9.7	0.003
	Liver					s(Size)	1	6.9	0.010
		$\delta^{15}\text{N}$	Y ~ Season + Area + Maturity + s(Size)	143.5	84.9	Season	3	37.6	0.000
						Area	1	107.5	0.000
						Maturity	1	1.4	0.247
						s(Size)	2.5	4.1	0.010
		$\delta^{13}\text{C}$	Y ~ Season + s(Size)	68.8	37.3	Season	3	2	0.120
YFT	Liver					s(Size)	3.9	8.7	0.000
		TLC	Y ~ Season + Sex + Maturity + s(Size)	642.7	46.6	Season	3	1.9	0.136
						Sex	2	5.2	0.007
						Maturity	1	3.2	0.078
						s(Size)	5.9	3.4	0.003

CHAPITRE 6. COMPÉTITION TROPHIQUE ET CHANGEMENTS ALIMENTAIRES ONTOGÉNIQUES CHEZ LES THONS TROPICAUX

Table 6.6: Statistics of F-test for each species and tissue of generalized additive models selected by Akaike Information Criterion (AIC) on (a) Neutral fatty acid (NFA) profiles summarized through non-metric multi-dimensional scaling coordinates (Dimension 1, Dimension 2 and Dimension 3), (b) Main NFA families when a significant size influence was detected in (a). BET: Bigeye; SKJ: Skipjack; YFT: Yellowfin; Y: Variable to explain; df: degree of freedom; edf: estimated degree of freedom for smoothed terms expressed as s(). Significant influences of terms are in bold.

Species	tissue	Y	Selected model	AIC	Deviance explained (%)	F-test				
						Terms	df/edf	F	P-value	
BET	Muscle	Dim1	Y ~ Season + Sex + s(Size)	-172	37.4	Season	3	6.0	0.002	
			Sex	2	2.7	0.079				
			s(Size)	2.1	4.0	0.016				
	Liver	Dim2	<i>Null</i>	-187	0					
		Dim3	Y ~ Season	-217	21.2	Season	3	3.1	0.082	
		Dim1	Y ~ s(Size)	-183	27.4	s(Size)	2.6	6.2	0.000	
		Dim2	Y ~ Area + s(Size)	-226	10.4	Area	1	4.8	0.033	
SKJ	Muscle	Dim1	Y ~ Area + s(Size)	-78.7	23.6	Area	1	6.5	0.010	
			s(Size)	2.3	2.7	0.054				
			Area	1	16.3	0.000				
	Liver	Dim2	Y ~ Area	-166	19.5	Area	1	16.3	0.000	
		Dim3	<i>Null</i>	-206	0					
		Dim1	Y ~ Area + Sex	-114	38	Area	1	7.8	0.007	
		Dim2	Y ~ Season + Sex + s(Size)	-120	40.4	Season	3	2.5	0.070	
YFT	Muscle	Dim1	Y ~ s(Size)	-188	46.5	s(Size)	6	5.7	0.000	
			Dim2	Y ~ Maturity + s(Size)	-185	31.5	Maturity	1	4.8	0.033
			s(Size)	6.9	2.4	0.027				
	Liver	Dim3	Y ~ Area	-122	5.8	Area	1	3.5	0.065	
		Dim1	Y ~ s(Size)	-170	37.6	s(Size)	3.3	7.5	0.000	
		Dim2	Y ~ Season + Sex + s(Size)	-226	33.9	Season	3	5.7	0.002	
		Sex	2	2.3	0.108					
(a)										
Species	tissue	Y	Selected model	AIC	Deviance explained (%)	Terms	df/edf	F	P-value	
BET	Muscle	MUFA	Y ~ Season + s(Size)	392.0	23.4	Season	3.0	3.4	0.025	
			s(Size)	1.6	5.6	0.007				
			Area	1.0	3.2	0.080				
	Liver	SFA	Y ~ Season + Area	419.1	15.1	Season	3.0	2.6	0.062	
		Area	1.0	8.1	0.006					
		MUFA	Y ~ Season + s(Size)	449.4	25.3	Season	3.0	2.4	0.074	
		s(Size)	1.0	6.0	0.018					
YFT	Muscle	PUFA	Y ~ s(Size)	430.9	23.6	s(Size)	3.8	8.0	0.001	
			SFA	<i>Null</i>	385.2	0.0				
			MUFA	Y ~ Maturity + s(Size)	326.4	59.8	Maturity	1.0	2.9	0.094
	Liver	SFA	s(Size)	4.9	10.8	0.000				
			Season	3.0	2.2	0.104				
			Sex	2.0	3.7	0.034				
			s(Size)	5.2	1.2	0.113				
(b)										

Table 6.7: Mean values (\pm standard deviation) of carbon and nitrogen isotopic data ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, ‰), total lipid content (% dw) and fatty acid profiles (neutral lipids as a % of total fatty acids) of the liver and muscle of skipjack tuna in the Western-Central Indian Ocean, according to gender. N is the number of samples for SI and NFA analyses.

	Liver			Muscle		
	Indeterminate	Female	Male	Indeterminate	Female	Male
n (SI NFA)	21 14	33 25	33 21	21 11	36 30	37 38
Size (cm)	35.3 \pm 3.9	53.3 \pm 11.0	58.5 \pm 9.4	35.3 \pm 3.9	53.3 \pm 11.0	58.6 \pm 8.6
$\delta^{13}\text{C}$	-17.8 \pm 0.4	-17.7 \pm 0.5	-17.7 \pm 0.4	-17.1 \pm 0.2	-17.0 \pm 0.2	-16.9 \pm 0.3
$\delta^{15}\text{N}$	11.2 \pm 0.2	10.5 \pm 0.6	11.1 \pm 0.5	11.2 \pm 0.2	11.4 \pm 0.4	11.6 \pm 0.7
TLC (% dw)	11.2 \pm 3.8	15.6 \pm 5.5	14.3 \pm 7.2	4.9 \pm 4.3	1.8 \pm 0.9	2.0 \pm 0.7
14:0	2.0 \pm 1.3	1.9 \pm 0.8	1.4 \pm 0.7	0.5 \pm 0.3	0.7 \pm 0.6	0.5 \pm 0.3
15:0	1.0 \pm 0.5	0.9 \pm 0.5	1.0 \pm 0.3	0.7 \pm 0.4	0.4 \pm 0.4	0.3 \pm 0.3
16:0	34.4 \pm 7.2	39.7 \pm 6.5	33.4 \pm 6.1	36.9 \pm 9.4	33.4 \pm 8.3	29.8 \pm 7.9
17:0	1.6 \pm 0.7	1.8 \pm 0.8	1.5 \pm 0.4	1.3 \pm 0.4	1.2 \pm 0.3	1.3 \pm 0.4
18:0	8.8 \pm 2.1	8.0 \pm 1.4	8.3 \pm 1.8	14.4 \pm 1.7	13.2 \pm 2.3	14.1 \pm 3.2
20:0	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.3 \pm 0.2	0.2 \pm 0.4	0.3 \pm 0.5
22:0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.2 \pm 0.6	0.3 \pm 0.6
ΣSFA	47.9 \pm 6.9	52.5 \pm 7.1	45.8 \pm 7.2	54.1 \pm 10.1	49.3 \pm 8.6	46.6 \pm 8.2
16:1 ω 7	2.5 \pm 1.2	3.6 \pm 1.1	2.3 \pm 0.8	1.9 \pm 1.0	1.7 \pm 0.9	1.4 \pm 0.7
17:1 ω 7	0.4 \pm 0.4	0.5 \pm 0.5	0.4 \pm 0.3	0.5 \pm 0.3	0.6 \pm 0.3	0.5 \pm 0.3
18:1 ω 9	9.9 \pm 4.6	12.3 \pm 3.6	8.6 \pm 4.0	6.8 \pm 1.5	8.0 \pm 1.4	8.3 \pm 1.2
18:1 ω 7	2.5 \pm 1.0	2.2 \pm 0.7	1.9 \pm 0.4	1.8 \pm 0.3	2.0 \pm 0.4	1.9 \pm 0.4
20:1 ω 9	0.4 \pm 0.3	0.3 \pm 0.2	0.2 \pm 0.2	0.3 \pm 0.2	0.3 \pm 0.3	0.3 \pm 0.3
22:1 ω 9	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.6 \pm 0.7	1.0 \pm 0.8	1.0 \pm 0.6
24:1 ω 9	2.8 \pm 2.8	1.6 \pm 1.2	1.7 \pm 1.6	0.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.5	0.3 \pm 0.4
ΣMUFA	18.7 \pm 5.0	20.6 \pm 5.1	15.3 \pm 4.7	12.1 \pm 2.2	13.8 \pm 1.8	13.6 \pm 2.1
18:3 ω 3	0.3 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.3	0.1 \pm 0.2
20:5 ω 3 (EPA)	6.5 \pm 1.9	4.3 \pm 1.6	6.2 \pm 1.4	4.9 \pm 1.1	5.1 \pm 0.8	5.1 \pm 0.9
22:5 ω 3	1.0 \pm 0.6	0.7 \pm 0.5	1.0 \pm 0.7	0.4 \pm 0.5	0.5 \pm 0.5	0.4 \pm 0.5
22:6 ω 3 (DHA)	18.3 \pm 3.8	15.9 \pm 5.6	23.0 \pm 4.0	21.8 \pm 7.9	23.3 \pm 5.8	25.0 \pm 5.3
18:2 ω 6	0.9 \pm 0.5	0.7 \pm 0.3	0.9 \pm 0.2	1.1 \pm 0.3	1.1 \pm 0.3	1.2 \pm 0.2
18:3 ω 6	0.6 \pm 0.5	0.2 \pm 0.2	0.2 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.2	0.1 \pm 0.2
20:2 ω 6	0.1 \pm 0.2	0.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	0.2 \pm 0.5	0.2 \pm 0.3
20:3 ω 6	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.1	0.0 \pm 0.1	0.1 \pm 0.2
20:4 ω 6 (AA)	3.3 \pm 1.0	3.3 \pm 0.8	4.3 \pm 1.1	3.1 \pm 0.8	4.0 \pm 0.9	4.5 \pm 1.1
22:2 ω 6	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.3	0.1 \pm 0.2
22:4 ω 6	0.3 \pm 0.2	0.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.2	0.0 \pm 0.1	0.0 \pm 0.1	0.0 \pm 0.1
22:5 ω 6	1.1 \pm 0.5	0.9 \pm 0.4	1.7 \pm 0.4	1.8 \pm 0.6	2.0 \pm 0.7	2.5 \pm 0.6
$\Sigma\omega$3	26.1 \pm 4.2	21.1 \pm 6.9	30.5 \pm 5.4	27.4 \pm 9.0	29.0 \pm 6.7	30.7 \pm 6.1
$\Sigma\omega$6	6.4 \pm 1.7	5.4 \pm 1.1	7.6 \pm 1.3	6.3 \pm 1.4	7.6 \pm 2.0	8.7 \pm 2.0
ΣPUFA	32.5 \pm 5.1	26.4 \pm 7.8	38.1 \pm 6.2	33.6 \pm 10.0	36.7 \pm 8.4	39.4 \pm 7.4

Chapitre 7

Composition proximale des tissus et condition des individus

Dans le chapitre 6, un changement alimentaire ontogénique chez *Thunnus albacares* et *T. obesus* a été observé au travers de la nature des AG assimilés. Chez *Katsuwonus pelamis*, l'alimentation variait relativement peu avec l'ontogénie mais les processus d'allocation d'énergie semblaient à l'origine de différences sexuelles. D'autre part les indices de condition basés sur les traits morphométriques sont couramment utilisés pour estimer le statut énergétique (voir section 2.1.1) bien que leur qualité en tant que proxies au niveau énergétique ne soit pas vérifiée chez ces espèces. Quelle est donc la part des différences alimentaires et des processus physiologiques sur le niveau des réserves énergétiques ? Et les indices de condition peuvent-ils rendre compte de ces variations ?

L'objectif de ce chapitre était donc de déterminer comment se répartissent les composés énergiques entre les principaux tissus, afin de tester dans quelle mesure des facteurs biologiques et environnementaux sont susceptibles d'affecter le statut énergétique. L'utilisation d'indices de condition couramment utilisés a également été vérifiée. L'influence de facteurs biologiques (taille, sexe, maturité sexuelle) et environnementaux (saison, habitat) sur les contenus en énergie (taux de lipides et de protéines) de quatre tissus (muscles blanc et rouge, foie, gonades) a été testée, et des indices morphométriques couramment employés dans les études de condition (indice de Le Cren, ratio entre circonférence et taille, indices gonado- et hépatosomatiques) ont été comparés aux contenus biochimiques (taux de lipides et de protéines, ratio TAG/ST et la densité en énergie). Il faut noter que le ratio TAG/ST rapporte la quantité de lipides de réserve à celle de lipides structuraux et a initialement été développé sur les larves (Fraser, 1989) afin de normaliser la quantité de lipide de réserve à la taille de chaque larve, cette dernière étant difficile à mesurer au stade larvaire. Cependant cette mesure a depuis été utilisée chez les thons tropicaux (Robert et al., 2014).

Il apparaît que les protéines ont été relativement bien conservées dans chaque tissu (niveaux de variation intra-spécifique faibles), confirmant que les protéines ne sont dégradées qu'en cas de situation extrême (e.g. jeûne prolongé), ce qui n'apparaît pas être le cas des individus étudiés. Aucun effet environnemental n'a été observé sur les niveaux en protéines, ainsi que peu d'effets biologiques à l'exception de niveaux en protéines largement plus élevés dans les ovaires que dans les testicules. Le stockage d'énergie sous forme de lipides est relativement faible dans le muscle blanc ; seuls le foie et le muscle rouge accumulent des lipides en vue d'une utilisation ultérieure, notamment chez *T. albacares*. Cependant le métabolisme lipidique du muscle rouge suggère que ces lipides sont principalement utilisés "sur place" pour la nage de routine via la β -oxydation.

CHAPITRE 7. COMPOSITION PROXIMALE DES TISSUS ET CONDITION DES INDIVIDUS

La mobilisation des lipides hépatiques vers les gonades, déjà suggérée dans des études précédentes, a été confirmée. Globalement, ces niveaux lipidiques augmentent avec la taille dans le foie mais diminuent alors dans le muscle rouge, et dépendent également des saisons. Considérant l'alimentation opportuniste des thons, ces variations saisonnières pourraient être en lien avec la nature plus ou moins grasse des différents types de proies rencontrées selon la saison et/ou zone (migrations saisonnières des thons et disponibilité ponctuelle de proies lors de *blooms*). Dans les gonades, des différences de taux de lipides entre mâles et femelles ont été observées, comme pour les taux de protéines, et indiquent que les femelles consacrent plus d'énergie à la production de cellules germinales que les mâles. Comme indiqué par les niveaux d'indice gonadosomatique, l'investissement à la production de telles cellules est également plus fort chez *K. pelamis* que chez les deux autres espèces.

Seul l'indice gonadosomatique a permis de rendre compte du contenu énergétique des gonades (notamment des ovaires) : les trois autres indices testés ne reflétaient pas le contenu énergétique des tissus (absence de corrélation) quelle que soit la forme d'énergie considérée, y compris pour le muscle blanc qui représente plus de 60 % de la masse totale des thons tropicaux. Leur utilisation en tant que proxys du statut énergétique, comme c'est souvent le cas chez des espèces tempérées, a donc été remise en question chez les thons tropicaux. Ces indices semblent en effet peu adaptés aux espèces 'maigres', qui stockent naturellement peu d'énergie. Il semble plus pertinent d'étudier la masse de tissu total en tenant compte de l'âge réel des individus. D'autre part les indices de condition sont uniquement basés sur un aspect quantitatif de l'énergie bien que l'aspect qualitatif soit important pour la santé, au travers des nutriments essentiels par exemple.

Manuscrit C : soumis

Are condition factors powerful proxies of energy content in wild tropical tunas?

Fany Sardenne¹, Emmanuel Chassot¹, Edwin Fouché^{1,2}, Frédéric Ménard³, Vincent Lucas⁴ & Nathalie Bodin¹

¹ IRD, UMR MARine Biodiversity Exploitation and Conservation (MARBEC), Victoria, SEYCHELLES.

² INRA, UMR TOXALIM, Research Centre in Food Toxicology, Toulouse, FRANCE.

³ IRD, UMR Mediterranean Institute of Oceanography (MIO), Marseille, FRANCE.

⁴ Seychelles Fishing Authority, Victoria, SEYCHELLES.

Key-words: fish health, proximate composition, energy variability, large pelagic species.

7.1 Abstract

The “condition” is used as indicator of fish health and is generally equated with the quantity of energy reserves. Biometric condition factors have been widely used and preferred over costly and time-consuming biochemical condition. Here, we investigated the relevance of four common condition factors based on biometric measurements (Le Cren’s index, girth-length index, gonado-somatic index and hepato-somatic index) and of size- and weight-based empirical models to describe the physiological condition of tropical tunas. Biometric condition factors of bigeye (*Thunnus obesus*), skipjack (*Katsuwonus pelamis*) and yellowfin (*Thunnus albacares*) tunas sampled throughout 2013 in the western Indian Ocean region were assessed against benchmark biochemical indices (lipid content, protein content, triacylglycerol:sterol ratio and energy density) estimated in tissues with different physiological functions, i.e. red muscle, white muscle, liver, and gonads. Our findings suggest that tropical tunas do not store lipids in white muscle and that protein content is more balanced than lipid content, which largely varies with ontogeny and the seasons according to tissue and species. This variability induced inconsistency between biometric factors, including the empirically adjusted ones, and biochemical indices, with the exception of the gonado-somatic index that fitted well to the composition of the gonads in the three species, and especially in females.

7.2 Introduction

In animal ecology, the term ‘condition’ is used to describe the general health or well-being of an individual and usually refers to the quantity of energy reserves (Stevenson and Woods, 2006). Stemming from diet sources, these reserves can be used to meet the energy demands for maintenance, growth, sexual maturation

CHAPITRE 7. COMPOSITION PROXIMALE DES TISSUS ET CONDITION DES INDIVIDUS

and reproduction (Jakob et al., 1996). In fish, their level directly impacts survival and trade-off in energy allocation (Post and Parkinson, 2001). The caloric content and tissue proximate composition analysis are thus the reference methods used to estimate the condition of an individual (e.g. Pangle and Sutton (2005); Domínguez-Petit et al. (2010)). Lipids function primarily as an energy reserve in fish and the level of lipids in an individual generally indicates the energy available for vital functions (Tocher, 2003). On the other hand, proteins will act as an energy source only in extreme case of starvation (McCue, 2010). Derived measures of condition were also developed, such as the lipid reserve index (i.e. triacylglycerol:sterol ratio, which are reserve and structural lipids respectively)(Fraser, 1989). However, morphometric measures are generally preferred over costly and time-consuming biochemical analyses to assess fish condition.

Historically used in fisheries research as early as the 1900s (Nash et al., 2006), morphometric condition factors are based on individual plumpness variations, considering that at a same size, a bigger fish is healthier (Ricker, 1975). Among a great number of morphometric factors available, the most commonly used is the relative condition factor (Kn) developed by Le Cren (1951), which is the ratio of a fish weight to its predicted weight as derived from a population-specific length-weight relationship (Bolger and Connolly, 1989). Other anatomical factors based on specific organ and tissue mass variations have been used to investigate reproduction dynamics: e.g. gonado and hepato-somatic indices (GSI and HSI), which relate the weight of gonads and liver to the somatic weight of the fish, respectively. Morphometric condition factors have been generally used as proxies of body lipid content (Grande et al., 2014; Zudaire et al., 2014). They have been shown to well reflect energy reserves in cold water species (Lambert and Dutil, 1997; Kaufman et al., 2007) and have been proven to be useful for studying the effects of environmental conditions on mortality (Dutil and Lambert, 2000), growth (Cardinale et al., 2002), recruitment success (Plourde et al., 2015) and fecundity (Marshall et al., 2006). Other studies, however, failed to attempt to correlate morphometric condition factors and body composition in temperate pelagic fish (Goñi and Arrizabalaga, 2010; McPherson et al., 2010). In tropical tunas, condition factors such as Fulton's (Ricker, 1975), GSI and HSI were related to the reproductive cycle (Grande et al., 2014; Zudaire et al., 2014), while others (girth orratio between girth and size; total lipid content and lipid storage index) were used to assess the impact of the association to floating objects on tunas' fitness (Marsac et al., 2000; Hallier and Gaertner, 2008; Robert et al., 2014). However, to the best of our knowledge, the relationships between morphometric condition factors and body composition have not been investigated yet in tropical tunas. Taking into account the global fishing pressure on tuna populations that has steadily increased over the last decades (Juan-Jordá et al., 2011), an accurate monitoring of tropical tunas health through individual condition is urgently required. Among the three major markets of tropical tunas targeted in the Indian Ocean, i.e. *Thunnus albacares* (yellowfin tuna; YFT), *Thunnus obesus* (bigeye tuna; BET) and *Katsuwonus pelamis* (skipjack tuna, SKJ), YFT has been recently classified as overfished (IOTC, 2015d).

The present study aimed to shed the light on bioenergetics profiles in wild populations of tropical tunas in the Western Indian Ocean: (i) to determine the main causes of energy variations in the three species through the analysis of proximate composition and (ii) to test the assumption that morphometric condition factors reflect the energy content in tropical tuna. Four common condition factors and empirical models based on size and weight were assessed monthly in the three tropical tuna species together with the proximate composition of their tissues (i.e. liver, gonads, white and red muscles used during fast- and slow-twitch respectively); the influence of biological and environmental factors on these variables was also investigated.

7.3 Material and methods

7.3.1 Data collection

A total of 223 BET, 178 SKJ and 230 YFT were sampled throughout 2013, on a basis of 15-20 individuals per month, at the unloading of purse seiners at Victoria, Seychelles. Fishing date and accurate GPS fishing location from purse seiners' logbooks allowed for the distinction of two main capture areas that differed according to their oceanographic specificities: Mozambique Channel (MOZ) and Western-central Indian Ocean (WCIO) (Fig. 7.1). Four seasons were also considered to account for the monsoon regime that strongly affects the oceanographic conditions in the Indian Ocean: Four seasons were considered to account for the monsoon regime that strongly affects the oceanographic conditions in the Indian Ocean: North-Eastern Monsoon (NEM) from mid-November to mid-March, Spring Inter-Monsoon (SIM) from mid-March to mid-May, South Western Monsoon (SWM) from mid-May to mid-September, and Autumn Inter-Monsoon (AIM) from mid-September to mid-November (Schott and McCreary Jr., 2001). All sampled fish were weighted (kg to the nearest 0.1 kg), measured in fork length, which refers to the length from the tip of the snout to the fork of the tail (F_L , cm to the nearest 0.5 cm) and measured in thorax girth (T_G , cm to the nearest 0.5 cm), which refers to the girth under the pectoral fins beneath the first dorsal spine. Weights of the gonads (W_G) and liver (W_L) were determined to the nearest g. Somatic weight (W_S) was then computed to the nearest 0.1 kg as the total fish weight minus the weight of all internal organs and remaining viscera. Sex was determined from macroscopic exam, except for individuals not developed enough for which it was recorded as "indeterminate" (I). These fish were considered immature. Maturity was determined from visual inspection of the gonads and split between developing (Dev, i.e. immature to developing fish) and spawning stage (Spa, i.e. spawning capable to resting fish; Brown-Peterson et al., 2011). Among the 631 tuna processed, 81 BET, 79 SKJ and 80 YFT were selected for biochemical analyses, based on their length, sex and sampling origin to cover most of the life cycle and main environmental conditions encountered. Samples of approximately 2 g (wet weight) of gonads (G) and liver (L), white muscle (W) and red muscle (R) were collected and stored at -80°C until biochemical analysis. For consistency, white muscle was systematically sampled under the dorsal spine on the left side and red muscle under the pectoral fin.

7.3.2 Biochemical analyses

Only lipid and protein contents were determined in the present study since glycogen levels are very low in fish, e.g. 0.36% in the wet white muscle of *T. alalunga* (Vlieg and Murray, 1988). In addition, glycogen is generally rapidly consumed because of the stress experienced during fishing operation (Black and Love, 1988).

Lipid class composition and total fat content. Approximately 250 ± 50 mg of 908 wet samples (231 W, 233 L, 229 R and 196 G) were weighed to the nearest mg, then crushed using a FastPrep System[®] (MP Biomedicals) and extracted with 2 ml of dichloromethane:methanol (2:1, v/v). After centrifugation, the lower layer was collected and re-suspended in a known volume of dichloromethane. An aliquot of the extract was spotted on quartz chromarods SIII (i.e. rods covered with silica) using a 5 μl Hamilton air-tight glass syringe, and separated into lipid classes in a three-phase development system: (i) 25 minutes in 99:1:0.05 hexane/diethyl ether/formic acid; (ii) 40 minutes in 80:20:1 hexane/diethyl-ether/formic acid; then (iii) 15 minutes in pure acetone, followed by two folds 10 minutes in 5:4:1 chloroform/methanol/water (Parrish, 1999). Lipid classes were quantified after each separation phase using an Iatroscan MK-6s (Iatron Laboratories) thin-

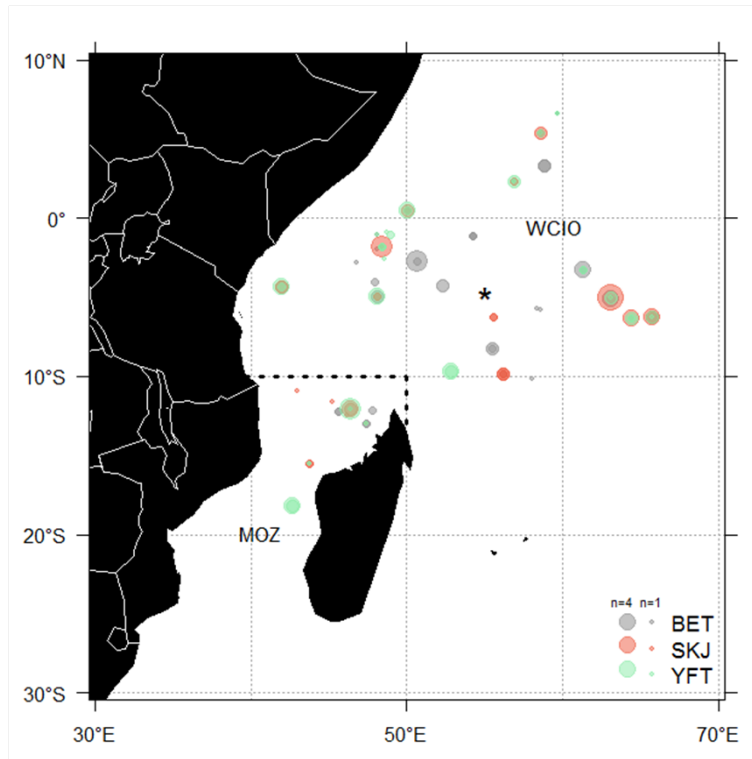


Fig. 7.1: Location of bigeye (BET), skipjack (SKJ) and yellowfin (YFT) caught in the Western Indian Ocean throughout 2013 and analyzed for biochemical content. The limit of the two study areas, Mozambique Channel (MOZ) and Western-Central Indian Ocean (WCIO) is indicated with dashed line. Star indicates Mahé Island (Seychelles).

layer chromatography-flame ionization detector analyzer (TLC–FID). The signal was detected in millivolts and quantified using lipid standards (Cholesteryl palmitate, glyceryl tripalmitate, cholesterol, oleic acid, DL-palmitine and phosphatidil choline, Sigma-Aldrich) with PeakSimple 3.93 Software. Concentrations of major lipid classes were determined and expressed in mg.g^{-1} on a wet weight (ww) basis: triacylglycerols (TAG), sterols (ST), free fatty acid, esterified sterols and wax ester, acetone mobile polar lipids and phospholipids. Lipid content refers to the sum of all these classes. Analytical variability of this method was $\pm 12\%$.

Total protein content. The crude protein content was determined for 886 samples (234 W, 232 L, 230 R and 187 G) by the bicinchoninic acid method (BCA, Smith et al., 1985) using bovine serum albumin as standard. Approximately $15 \pm 5 \text{ mg ww}$ were weighed to the nearest mg, and conditioned on ice with 0.5 ml of lysis buffer containing 2% of sodium dodecyl sulfate to overcome lipid interference (Morton and Evans, 1992). Tissues were grinded in mixer mill (MM400, Retsch) for 3-4 minutes (oscillation frequency 19 Hz) then cooled by a brief stint in liquid nitrogen. Extracts were centrifuged for 45 minutes at 13,200 rpm at 4°C , then diluted and incubated with BCA reactive (Sigma-Aldrich) for 30 minutes at 37°C . Absorbance at 520 nm was assessed (average of 125 readings per sample) by an optical spectrophotometer (Infinite 200, TECAN). Protein content is expressed in $\text{mg.g}^{-1} \text{ ww}$. Analytical variability of the method was $\pm 11.6\%$.

7.3.3 Biometric and biochemical indicators

A panel of eight indices commonly used was considered, including two morphometric and two anatomic indices, subsequently grouped under the term biometric indices, and four biochemical indices (Table 7.1). Among them, the energy density is a conversion of energetic contents in Joules, a key input in bioenergetics studies (Kleiber, 1961). It is noteworthy that the condition factor K_n was computed with the somatic weight, to avoid any bias due to the variability in stomach contents and gonads weights (Lambert and Dutil, 1997).

Table 7.1: Biometric and biochemical indices and their respective formulas used in the present study. W_{std} is the somatic weight predicted for each individual given its F_L and according to the population Length-Somatic weight relationship (see Table 7.2 for parameters).

	Name (symbol)	Formula	References
Biometric indices	Condition factor (Kn)	$Kn = 100 \times \frac{W_S}{W_{std}^3}$ with $W_{std} = a \times F_L^b$	Le Cren (1951)
	Girth-Length index	T_G/F_L	Goñi and Arrizabalaga (2010)
	Gonado-somatic index (GSI)	$GSI = 100 \times \frac{W_G}{W_S}$	-
	Hepato-somatic index (HSI)	$HSI = 100 \times \frac{W_L}{W_S}$	-
Biochemical indices	Lipid content	-	-
	Protein content	-	-
	Lipid storage index	TAG/ST	Fraser (1989)
	Energy density (E_D)*	$E_D = lipid\ content \times 39.5 + protein\ content \times 23.6$ with lipid en protein content in g	energy equivalents from Kleiber (1961)

* E_D is expressed in $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$

Table 7.2: Parameter estimates (mean \pm standard deviation) of the Length-Somatic weight relationships, using the least squares estimates, for tropical tunas from the Western Indian Ocean: $W_{std} = a \times F_L^b$ with W_{std} the somatic weight (in kg) and F_L the fork length (in cm). n give the number of individuals used.

	a	b	n
BET	$2.51 \times 10^{-5} \pm 3.80 \times 10^{-6}$	$2.98 \pm 3.07 \times 10^{-2}$	230
SKJ	$4.63 \times 10^{-6} \pm 7.96 \times 10^{-7}$	$3.37 \pm 4.21 \times 10^{-2}$	178
YFT	$1.45 \times 10^{-5} \pm 2.61 \times 10^{-6}$	$3.06 \pm 3.68 \times 10^{-2}$	223

7.3.4 Statistical analyses

The relative importance of biological (species: S; size: F_L ; sex: X; maturity: M) and environmental (season: P and area of catch: A) covariates on the variability in biochemical contents was evaluated in each tissue separately following the model:

$T_i = a + S_i + F_{Li} + X_i + M_i + P_i + A_i + \varepsilon_i$, with T the fat or the protein content, a the intercept, i indicate fish, and ε is the random noise term assumed to be normally distributed with mean zero and constant variance. Covariate selection was based on Aikake Information Criterion. F-tests on multiple regressions and t-tests were then applied on centered and reduced data, and normality and homoscedasticity of the residuals checked. Inter- and intra- specific comparisons of lipid class concentrations (TAG, ST) and biometric indices were checked using Wilcoxon's tests. The relationships between biochemical and biometric indices were investigated for each species with Spearman correlation tests. Finally, coefficients of variation (CV, expressed in %) were computed for all indices to compare their relative variability.

Finally, we assessed the reliability of empirical models based on size and somatic weight to predict fish lipid and protein contents. Non-linear models were adjusted for the two muscles (i.e. tissues that constitute the somatic weight) of each species, following the general model proposed by Hayes and Shonkwiler (2001):

$T_i = \delta + \alpha (W_{Si} - F_{Li})^\beta + \varepsilon_i$, with T the lipid or protein content, W_S the somatic weight, F_L the size, i the fish, and ε the random noise term assumed to be normally distributed with mean zero and constant variance. Model parameters (δ , α and β) were estimated based on a non-linear estimation approach implemented in the *nls* function of the 'MASS' R package. To assess the quality of each model, predicted values for lipid and protein contents were compared to the observed data using Root Mean Square Error (RMSE) calculation, and paired Wilcoxon's test. All statistical analyses were performed using R 3.0.2 software.

7.4 Results

7.4.1 Changes in proximate composition

Tropical tunas are characterized by highly variable lipid content between tissues. The overall CV ranked liver (68.3%) > gonads (58.8%) > white muscle (57.0%) > red muscle (46.8%) (Table 7.3). The protein content in tropical tunas also varied between tissues, but to a lesser extent and CV ranked gonads (32.1%) > liver (20.9%) > red muscle (15.8%) > white muscle (11.9%) (Table 7.3).

Overall, among all the covariates, the species was the main source of protein content variations (Table 7.4a). The protein content in liver and gonads was higher in SKJ, while no difference was detected between YFT and BET and it ranked SKJ > BET > YFT in red muscle whereas it ranked BET > SKJ > YFT in white muscle (Table 7.4a). In addition, the protein content in gonads was remarkably low in male (87.4 ± 23.1 mg.g⁻¹) compared to female and immature fish (127.0 ± 32.8 mg.g⁻¹), but slightly increased with size (Table 7.4a). The protein content was slightly higher in the liver during SIM (178.2 ± 42.0 mg.g⁻¹) than during the other seasons (in average 169.0 ± 33.9 mg.g⁻¹). A very limited variability in the protein content was observed in all tissues, in particular in red and white muscles.

The lipid content was mainly affected by differences between species and season/area changes (Table 7.4b). The high individual variability results in a small explained deviance (R^2 adjusted < 0.15; Table 7.4b). YFT had fatter gonads and liver than BET and SKJ while the leanest muscles were recorded in SKJ (Table 7.3). Overall, the lipid content in the tissues slightly increased with fish size, except for the white muscle which exhibited very low lipid content in the three tropical tuna species (in average 3.2 ± 1.8 mg.g⁻¹). Seasonal

changes occurred with leaner red muscles measured during SIM and SWM (grand mean $13.3 \pm 6.6 \text{ mg.g}^{-1}$) than during AIM and NEM (grand mean $16.7 \pm 6.7 \text{ mg.g}^{-1}$), and an opposite pattern observed regarding white muscle (3.5 ± 2.0 vs. $2.6 \pm 1.2 \text{ mg.g}^{-1}$ respectively). Moreover, livers from WCIO were slightly fatter than in MOZ (all species mixed: 16.9 ± 11.7 and $13.4 \pm 7.8 \text{ mg.g}^{-1}$ respectively, $p < 0.05$). No influence of maturity and sex was detected on the lipid content in any tissue (Table 7.4b).

Among lipid classes, TAG showed the highest variations in the four tissues (from 102% in red muscle to 191.4% in white muscle), the lowest being noticed for ST (from 42.3% in gonads to 61.5% in red muscle). TAG content was generally lower in SKJ than in the two other tunas, and was the main contributor to lipid content in the liver and red muscle for the three species (Table 7.3). In the liver, TAG content was significantly higher in YFT than in BET and SKJ (both $p < 0.05$) while more variable in BET (CV=141%) and YFT (CV=116%) than in SKJ (CV=71%). The same patterns were observed in the muscles, although no significant differences in mean TAG values were noted (except between YFT and SKJ in the red muscle, $p < 0.001$). The TAG variability was higher in the white muscle than in the red one and in BET and YFT: CVs were higher in BET (197 and 107% in white and red muscles, respectively) than in YFT (180 and 92%) and SKJ (93 and 89%). Finally, in the gonads, TAG content was lower in BET than in SKJ ($p < 0.05$) and YFT ($p < 0.05$). ST content was lower than TAG in the three species and was higher in the gonads than in the liver, red muscle and white muscle (Table 7.3).

Tissue	Species	n	Protein content	Lipid content	Lipid classes	
					TAG	ST
Gonads	BET	63/65	104.6 ± 29.0	11.4 ± 6.1	1.3 ± 2.2	1.8 ± 0.8
	SKJ	67/72	115.5 ± 40.2	11.2 ± 5.7	2.0 ± 2.1	1.7 ± 0.6
	YFT	58/63	104.4 ± 32.7	14.6 ± 9.2	3.9 ± 5.4	1.8 ± 0.8
Liver	BET	78/80	159.4 ± 20.3	17.2 ± 13.7	5.8 ± 8.8	1.0 ± 0.5
	SKJ	79/79	200.8 ± 38.8	12.2 ± 5.5	3.8 ± 2.7	1.0 ± 0.4
	YFT	78/79	151.9 ± 24.2	20.5 ± 14.2	10.2 ± 11.9	1.1 ± 0.5
Red muscle	BET	81/79	190.0 ± 25.4	15.2 ± 8.1	5.1 ± 5.9	0.4 ± 0.3
	SKJ	76/76	205.9 ± 23.2	12.2 ± 5.3	3.1 ± 2.8	0.3 ± 0.2
	YFT	77/79	168.9 ± 27.6	16.2 ± 6.8	5.8 ± 5.3	0.3 ± 0.1
White muscle	BET	80/80	221.0 ± 21.6	4.1 ± 7.4	1.2 ± 6.4	0.2 ± 0.1
	SKJ	75/76	206.4 ± 24.2	2.6 ± 1.2	0.3 ± 0.3	0.2 ± 0.1
	YFT	80/80	198.0 ± 22.5	3.7 ± 2.3	0.8 ± 1.5	0.1 ± 0.1

Table 7.3: Protein and lipid contents, and levels in two lipid classes, TriAcylGlycerols (TAG) and Sterols (ST) of the gonads, liver, red and white muscles of bigeye tuna (BET), skipjack tuna (SKJ) and yellowfin tuna (YFT) from the Western Indian Ocean. Values are expressed in mg.g^{-1} ww and reported in mean \pm standard deviation. n give the number of samples analyzed for proteins/lipids (i.e. both lipid content and lipid classes).

7.4.2 Correlation between biochemical and biometric indices

Biometric indices showed relatively small variations in the populations under consideration. The CV of Kn ranked from 8.6% in SKJ to 10.6% in BET, and that of T_G/F_L from 4.1% in YFT to 5.6% in SKJ (Table 7.5). However, BET had significantly lower Kn than YFT and SKJ (both $p < 0.0001$) which in turn exhibited similar values ($p = 0.06$). An opposite trend was noted for T_G/F_L , with the highest values recorded for BET, followed by YFT and SKJ (all $p < 0.0001$; Table 7.5). Mean GSI was significantly much higher in SKJ than in YFT and in BET (both $p < 0.0001$) while no difference was noted between the two latter ($p = 0.06$). Similar patterns were observed for HSI, with higher values in SKJ than in YFT and in BET (both $p < 0.0001$), and higher values in YFT than in BET ($p < 0.05$).

Generally, biometric indices were mostly found to be related to the lipid composition (i.e. lipid content and TAG/ST ratio) and to a lesser extent to the energy density in all tissues. The protein content was

CHAPITRE 7. COMPOSITION PROXIMALE DES TISSUS ET CONDITION DES INDIVIDUS

Table 7.4: Results of multiple regression analyses (F-tests) and associated t-tests performed in four tissues (gonads, liver, red and white muscles) to detect the relative influence of biological (species: BET, SKJ, YFT; size noted as F_L ; sex: In, F, M; and maturity: Dev. or Spa.) and environmental (seasons: NEM, SWM, AIM, SIM; and area: MOZ and WCIO) variables on (a) protein content and (b) lipid content (see 7.3.1 for modality details).

(a)

tissue	F-test			Variable	Moda- lity	t test			
	F	P-value	r ² adjusted			partial coeff.	sd	t	P-value
Gonads	29.1	0.000	0.38	(Intercept)		-1.04	0.08	-12.39	<0.0001
				<i>F_L</i>		0.13	0.06	2.15	0.03
				species	SKJ	0.39	0.12	3.22	0.00
				sex	I	-0.26	0.17	-1.49	0.14
				sex	M	-0.92	0.09	-10.38	<0.0001
Liver	26.2	0.000	0.40	(Intercept)		-0.66	0.17	-3.97	0.00
				season	NEM	0.15	0.10	1.51	0.13
				season	SIM	0.37	0.13	2.84	0.00
				area	WCIO	0.21	0.14	1.49	0.14
				species	SKJ	0.91	0.10	9.45	<0.0001
				species	YFT	-0.14	0.10	-1.40	0.16
				sex	I	0.31	0.09	3.34	0.00
Red muscle	28	0.000	0.26	(Intercept)		0.42	0.06	6.43	0.00
				species	SKJ	0.32	0.09	3.64	0.00
				species	YFT	-0.44	0.09	-5.17	0.00
				sex	I	-0.14	0.08	-1.63	0.10
White muscle	8.13	0.000	0.16	(Intercept)		0.78	0.13	6.20	0.00
				season	SIM	0.17	0.10	1.75	0.08
				area	WCIO	0.16	0.11	1.48	0.14
				maturity	Spa	0.11	0.07	1.59	0.11
				species	SKJ	-0.33	0.08	-4.19	0.00
				species	YFT	-0.48	0.08	-6.27	0.00

(b)

tissue	F-test			Variable	Moda- lity	t test			
	F	P-value	r ² adjusted			partial coeff.	sd	t	P-value
Gonads	4.36	0.002	0.06	(Intercept)		-0.19	0.12	-1.62	0.11
				<i>F_L</i>		0.23	0.08	2.83	0.01
				species	SKJ	0.28	0.17	1.63	0.10
				species	YFT	0.36	0.14	2.61	0.01
				sex	I	0.32	0.19	1.70	0.09
Liver	7.89	0.000	0.13	(Intercept)		-0.21	0.28	-0.78	0.44
				<i>F_L</i>		0.28	0.08	3.64	0.00
				season	SIM	0.36	0.23	1.56	0.12
				area	WCIO	0.58	0.26	2.19	0.03
				species	YFT	0.55	0.16	3.39	0.00
Red muscle	6.94	0.000	0.11	(Intercept)		0.64	0.10	6.62	0.00
				<i>F_L</i>		-0.12	0.05	-2.39	0.02
				season	SIM	-0.34	0.12	-2.78	0.01
				season	SWM	-0.46	0.11	-4.32	0.00
				species	SKJ	-0.39	0.12	-3.13	0.00
				species	YFT	0.24	0.11	2.12	0.04
White muscle	4.07	0.008	0.04	(Intercept)		-0.96	0.02	-38.38	< 0.0001
				season	SIM	0.08	0.03	2.29	0.02
				season	SWM	0.10	0.03	3.40	0.00
				maturity	Spa	0.04	0.03	1.41	0.16
				species	SKJ	-0.11	0.03	-4.06	0.00

		Mean±SD	Range	CV (%)	<i>n</i>
BET	F_L	81.6 ± 36.7	29.5 — 166.5	44.9	230
	Kn	1.01 ± 0.1	0.66 — 1.74	10.6	229
	T_G/F_L	0.77 ± 0.0	0.58 — 0.94	5.4	229
	GSI	0.25 ± 0.4	0 — 2.57	154.9	230
	HSI	0.89 ± 0.3	0.23 — 2.51	35.3	228
SKJ	F_L	49.8 ± 9.2	30 — 72.3	18.4	178
	Kn	1.07 ± 0.1	0.83 — 1.42	8.6	178
	T_G/F_L	0.68 ± 0.0	0.57 — 0.79	5.6	178
	GSI	2.01 ± 1.3	0 — 5.37	62.3	176
	HSI	1.12 ± 0.4	0.4 — 2.11	31.9	175
YFT	F_L	63.3 ± 35.7	29 — 157	45.8	223
	Kn	1.05 ± 0.1	0.68 — 1.32	8.6	223
	T_G/F_L	0.7 ± 0.0	0.61 — 0.78	4.1	223
	GSI	0.3 ± 0.5	0 — 3.63	164.1	221
	HSI	0.93 ± 0.3	0.41 — 2.34	26.3	219

Table 7.5: Size (F_L , cm) and biometric indices (condition factors: Kn and T_G/F_L ; gonado- and hepato-somatic indices, GSI and HSI respectively) recorded in the Western Indian Ocean during 2013 for bigeye tuna (BET), skipjack tuna (SKJ) and yellowfin tuna (YFT).

weakly related to the biometric indices, except in the gonads and despite the sexual differences previously observed for proteins content in this tissue. GSI was positively correlated with the biochemical composition of the gonads (i.e, lipid and protein contents, TAG/ST ratio and energy density; $p < 0.05$ and $\rho^2 > 0.3$ for all; Table 7.6), especially in BET and YFT (Fig. 7.2). Nonetheless, HSI showed no clear relationship with the biochemical composition of the liver in the three species. No correlation was detected between Kn and the biochemical composition of the white muscle. In the three species, a positive but weak correlation was found between TAG/ST in red muscle and Kn ($p < 0.05$ and $\rho^2 = 0.06\text{--}0.14$). No correlation was found between T_G/F_L and the tissue biochemical content, except a significant but weak relationship with the composition of the gonads in SKJ, and in BET to a lesser extent.

7.4.3 Empirical models for prediction of biochemical contents

Paired Wilcoxon's comparisons between the observed biochemical content of the muscles and predicted somatic values gave no significant difference for any prediction and mean prediction errors were low but maximum differences were high for each muscle and species (Table 7.7), leading to very poor and thus useless prediction quality (Fig. 7.3).

7.5 Discussion

Morphometric condition factors are commonly used in studies of fish health without clarifying what they depict. Such a validation step seems necessary prior to their use as proxies of tuna health. Biochemical analyses conducted on four tissues of three tropical tunas exhibited a high inter- and intra-specific variability in the lipid content, while the protein content was more balanced. Some biological and environmental sources of variability in the lipid and protein contents were highlighted, especially ontogenic and seasonal changes linked to the monsoon regime of the Indian Ocean. This variability was not captured by the biometric condition factors considered in the present analysis, with the exception of GSI.

CHAPITRE 7. COMPOSITION PROXIMALE DES TISSUS ET CONDITION DES INDIVIDUS

Table 7.6: Spearman correlation tests between biometric indices (condition factors: Kn and T_G/F_L ; gonado- and hepato-somatic indices, GSI and HSI respectively) and biochemical characteristics (total fat and protein contents in mg.g^{-1} ww; TAG/ST ratio; total energy density in kJ.g^{-1} ww) of four tissues of tropical tuna from the Western Indian Ocean. Significant correlations are in bold; ρ correlation coefficients over 0.5 are in bold-italic. BET=bigeye tuna, SKJ=skipjack tuna, YFT=yellowfin tuna.

Species	Biometric Indices	Correlation test	Fat content				Protein content				TAG/ST				Energy density			
			gonad	liver	red muscle	white muscle	gonad	liver	red muscle	white muscle	gonad	liver	red muscle	white muscle	gonad	liver	red muscle	white muscle
BET	Kn	p-value	0.02	0.67	0.18	0.83	0.05	0.41	0.03	0.87	0.04	0.27	0.00	0.07	0.01	0.38	0.95	0.99
		ρ	0.26	0.05	0.15	0.02	0.22	-0.10	-0.25	-0.02	0.22	0.13	0.37	0.21	0.29	-0.10	0.01	0.00
	T_G/F_L	p-value	0.01	0.62	0.91	0.04	0.14	0.93	0.08	0.77	0.00	0.61	0.49	0.38	0.03	0.11	0.51	0.04
		ρ	0.29	-0.06	-0.01	-0.23	0.17	-0.01	-0.20	0.03	0.36	-0.06	0.08	0.10	0.25	-0.18	0.08	-0.23
	GSI	p-value	0.00	0.90	0.50	0.75	0.00	0.97	0.15	0.58	0.00	0.07	0.04	0.63	0.00	0.10	0.00	0.44
		ρ	0.81	0.02	-0.08	-0.04	0.77	0.01	-0.16	-0.06	0.74	0.21	0.23	0.05	0.78	-0.19	-0.35	-0.09
SKJ	HSI	p-value	0.00	0.14	0.02	0.44	0.00	0.41	0.16	0.18	0.00	0.00	0.45	0.60	0.00	0.34	0.14	0.45
		ρ	-0.34	0.17	0.27	-0.09	-0.41	-0.10	-0.16	0.15	-0.36	0.34	0.09	-0.06	-0.34	-0.11	0.17	-0.09
	Kn	p-value	0.66	0.00	0.68	0.49	0.70	0.57	0.87	0.47	0.81	0.01	0.03	0.48	0.48	0.01	0.36	0.42
		ρ	0.05	0.37	0.05	0.08	0.05	-0.07	-0.02	0.09	0.03	0.29	0.25	-0.08	0.08	0.31	-0.11	0.10
	T_G/F_L	p-value	0.00	0.05	0.20	0.57	0.00	0.08	0.65	0.02	0.01	0.16	0.75	0.57	0.00	0.30	0.53	0.36
		ρ	0.50	0.23	-0.15	0.07	0.40	-0.20	0.05	0.28	0.30	0.16	-0.04	-0.07	0.51	0.12	-0.07	0.11
YFT	GSI	p-value	0.00	0.83	0.70	0.13	0.00	0.60	0.08	0.43	0.00	0.92	0.01	0.89	0.00	0.33	0.35	0.23
		ρ	0.59	0.02	-0.05	0.18	0.58	0.06	0.21	-0.09	0.59	0.01	-0.31	-0.02	0.52	-0.11	0.11	0.14
	HSI	p-value	0.42	0.02	0.05	0.37	0.35	0.80	0.36	0.64	0.23	0.15	0.04	0.76	0.96	0.02	0.44	0.35
		ρ	0.09	0.27	0.23	0.11	0.11	0.03	-0.11	0.06	0.14	0.17	0.24	-0.04	-0.01	0.27	0.09	0.11
	Kn	p-value	0.00	0.46	0.00	0.39	0.00	0.58	0.29	0.84	0.02	0.05	0.01	0.42	0.00	0.22	0.07	0.25
		ρ	-0.39	0.09	0.35	0.10	-0.46	0.06	-0.12	0.02	-0.27	0.23	0.31	0.09	-0.41	-0.14	0.21	0.13
YFT	T_G/F_L	p-value	0.35	0.16	0.07	0.34	0.55	0.41	0.05	0.70	0.29	0.00	0.07	0.11	0.21	0.82	0.30	0.90
		ρ	0.11	0.16	0.21	0.11	0.07	-0.10	-0.23	-0.04	0.12	0.33	0.20	0.18	0.15	-0.03	0.12	0.01
	GSI	p-value	0.00	0.00	0.51	0.88	0.00	0.00	0.83	0.01	0.00	0.01	0.16	0.00	0.00	0.00	0.03	0.06
		ρ	0.78	0.41	-0.08	0.00	0.79	-0.43	0.02	0.28	0.53	0.31	0.16	0.36	0.81	0.36	-0.25	-0.21
	HSI	p-value	0.03	0.21	0.01	0.48	0.13	0.72	0.24	0.17	0.34	0.04	0.00	0.98	0.01	0.92	0.01	0.03
		ρ	-0.25	0.14	0.28	0.08	-0.18	-0.04	-0.14	0.16	-0.11	0.24	0.33	0.00	-0.31	-0.01	0.28	0.24

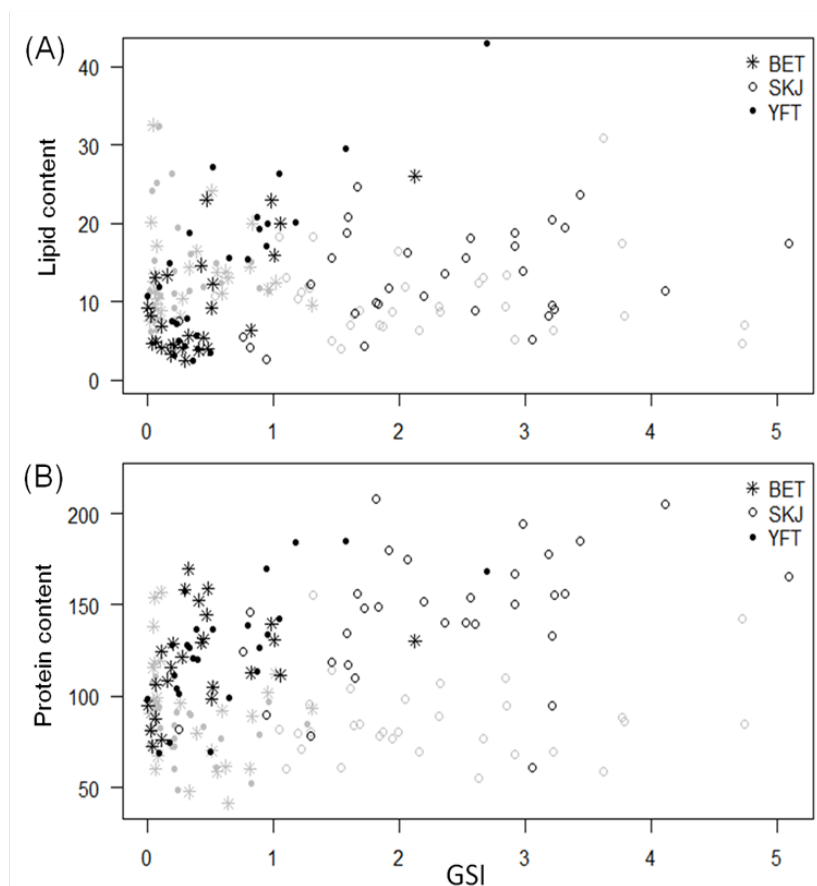


Fig. 7.2: Relationships between the gonado-somatic index (GSI) and (A) lipid content, and (B) protein content measured in ovary (black symbols) and testis (grey symbols) of bigeye tuna (BET), skipjack tuna (SKJ) and yellowfin tuna (YFT) collected throughout 2013 in the Western Indian Ocean. Lipid and protein content are expressed in $mg.g^{-1}$ ww.

	White muscle		Red muscle	
	Lipid content	Protein content	Lipid content	Protein content
BET	p-value	0.26	0.24	0.82
	mean error	<0.1	<0.1	<0.1
	max. error	6.5	22.4	69.9
	RMSE	1.7	7.3	25.1
SKJ	p-value	0.47	0.41	0.7
	mean error	<0.1	<0.1	<0.1
	max. error	3.6	18.2	57.1
	RMSE	1.2	5.1	22.9
YFT	p-value	0.62	0.42	0.86
	mean error	<0.1	<0.1	<0.1
	max. error	9.9	21.9	67.5
	RMSE	2.2	6.9	27.0

Table 7.7: P-values of paired Wilcoxon's tests comparing predicted somatic lipid and protein contents and those measured in white and red muscles (together making up somatic body) of tropical tunas from the Western Indian Ocean. Mean and maximum (noted 'max.') errors in prediction and Root Mean Squared Errors (RMSE) are expressed in $mg.g^{-1}$ ww.

7.5.1 Variability in biochemical composition of tuna tissues

The lipid and protein contents observed in this study were in agreement with those previously obtained. They confirmed that there is almost no lipid reserve in the white muscle of tropical tunas and that the protein content is more balanced than lipid content. In female SKJ and YFT from the same area, Grande (2013), Bodin et al. (2014) and Zudaire et al. (2014) observed lipid contents of 3–5 $mg.g^{-1}$ ww in the white muscle, up to 10–30 $mg.g^{-1}$ ww in the liver and 5–40 $mg.g^{-1}$ ww in the gonads according to maturity stage. Similar observation were made in other oceans: Balogun and Talabi (1985) found that the white muscle of

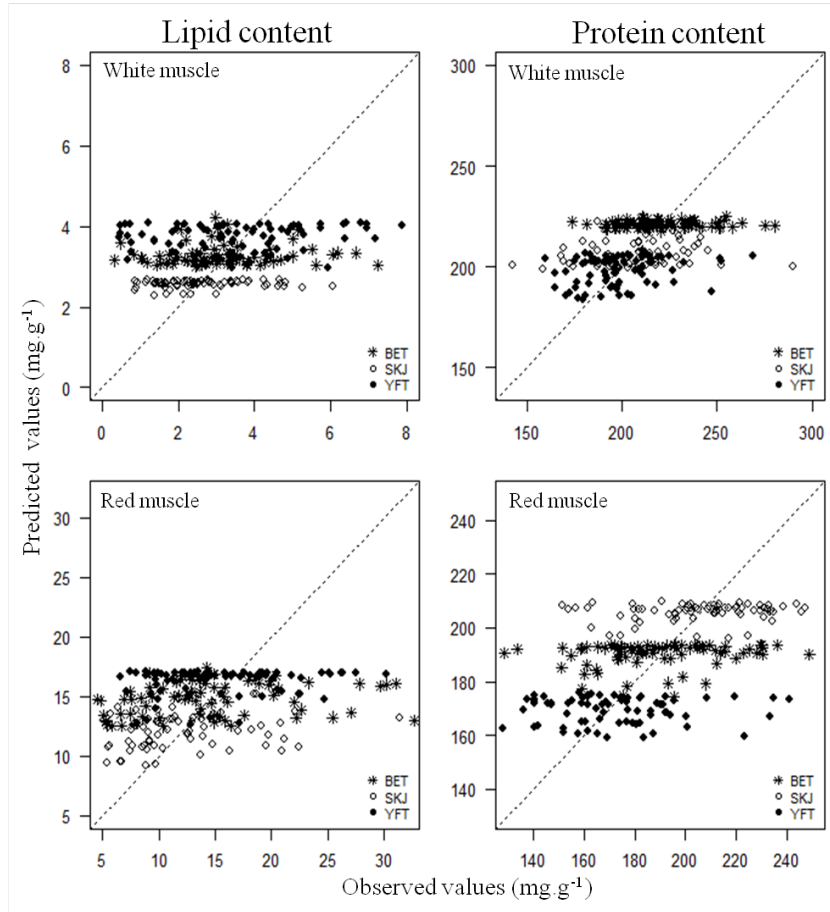


Fig. 7.3: Relationships between measured lipid (left panel) and protein (right panel) contents in white (top panel) and red (bottom panel) muscles (together making up somatic body) of three tropical tuna from the Western Indian Ocean and predicted somatic biochemical values from empirical models based on fish size and somatic weight. Dashed line is the 1:1 line. Models' details are given in 'statistical analyses' section. BET=bigeye, SKJ=skipjack, YFT=yellowfin.

SKJ from the Atlantic Ocean contained in average 1.9 mg.g^{-1} ww of lipids and 237 mg.g^{-1} ww of proteins, with substantial changes according to month. In the Pacific Ocean, Peng et al. (2013) found similar contents of lipids (in average 2 mg.g^{-1} ww) and proteins (in average 236 mg.g^{-1} ww) in the white muscle of BET and YFT.

Tropical tunas are opportunistic predators able to feed on a large range of preys (Ménard et al., 2007a). Major changes in the distribution and abundance of tuna preys have been observed in the Indian Ocean in relation with monsoon regimes (Romanov et al., 2009), large environmental anomalies such as the 1997 ENSO event (Ménard et al., 2007b) and unexplained extreme events such as 'blooms' of shrimps in the early 2000s (Romanov et al., 2015). Changes in tuna prey availability may have direct effects on tuna diet and the associated energy supply. The lipid and protein contents of tropical tunas, mainly used as benchmark to assess the condition, might depend to such unusual events in each area (e.g. bloom of fatty preys), but were not documented during this study. The area of origin of the fish affected the lipid content in the liver, suggesting that tropical tunas feed on less energetic preys in the Mozambique channel. In this sense, Zudaire et al. (2015) analyzed stomach contents of females YFT and noted higher occurrences of cephalopods in MOZ than in WCIO, which are relatively leaner prey (Zuyev et al., 2002), while YFT preferred to prey upon the fatty fish *Cubiceps pauciradiatus* during spawning period occurring within Seychelles' EEZ. The lipid relocation from the liver to the gonads in YFT (Zudaire et al., 2014) might explain the higher variability in the lipid content in the liver and suggests a similar mechanism in BET, which in turn was low in SKJ (Grande et al., 2014). Limited but significant seasonal changes in the lipid content were observed in the red

muscle, with higher reserve during AIM and NEM (i.e. from mid-September to mid-March) than during the two other seasons, which suggests that liver is not the only organ accumulating lipids. However, as the red muscle metabolism is mainly based on lipids (Dickson, 1996), we cannot specify if this accumulation is only for use *on site* (through β -oxidation) or if an export to others tissues might be possible. In addition, the lipid content increased with size in the gonads and liver, suggesting ontogenic changes in energy allocation in relation with reproduction (Zudaire et al., 2014) and in diet (Sardenne et al., submitted). A limited influence of sex was observed, with the exception of higher protein content in ovaries than in testis (Fig. 7.2), probably reflecting the lipoprotein-rich eggs (Hiramatsu et al., 2015).

7.5.2 Weakness of biometric indices

In practice, the use of biometric indices depends on those two requirements: the indices should be quickly and easily obtained and be a reliable proxy for energy content.

Our results suggest that biometric indices such as Kn , T_G/F_L and HSI should be used with caution in tropical tuna as they may not reflect the level of the energy compounds in the tissues. As regards Kn , most sampled fish ranged between 0.8 and 1.2, suggesting that contrasts were not strong enough to detect a correlation with proximate composition: e.g. a correlation was observed in cod *Gadus morhua* for which Kn ranged between 0.45 and 1.1 (Lambert and Dutil, 1997). Moreover, similar discrepancies between biometric indices and the lipid content (i.e. no correlation) were observed on two temperate tunas and attributed to allometry of fish shape with growth (Goñi and Arrizabalaga, 2010). The use of size and weight-based empirical adjustments to predict somatic biochemical (lipid/protein) contents did not produce a better correlation (Fig. 7.3), which strengthens our previous assumption that biometric indices based on fish size-weight relationships only are not good proxies of the biochemical content of the tropical tunas' muscles.

With regard to the organo-somatic indices, Zudaire et al. (2014) noted a positive relationship between HSI and the lipid content in the liver in females YFT that was not found here for any of the species when sexes were aggregated. This weak correlation was probably related to sexual differences in liver functions and energy allocation: e.g. the vitellogenin is synthesized only in the females liver for egg synthesis (Hiramatsu et al., 2015). Like Zudaire et al. (2014), we also obtained a positive correlation between GSI and the lipid content of gonads. Thus, GSI seemed a reliable indicator of ovary energy content and reproductive cycle, but to a lesser extent in testis (Fig. 7.2), and might be relevant for monitoring the maturity status of tunas over space and time as an alternative to biochemical analysis. In addition, the GSI was a reliable indicator of steroid hormone content in both sexes of SKJ and YFT (Stéquert et al., 2001). Moreover, the inter-species differences of GSI ranges confirmed that SKJ invest more in the germinal cell production than YFT and BET (Grande et al., 2014; Stéquert et al., 2001).

Morphometric measurements remain useful, as they constitute functional features subject to selective pressure that might be affected by fishing in the long-term (Shin et al., 2005). Our findings emphasize the importance of understanding the relationship between morphometric indices and energy contents in fish to interpret accurately any change in biometric indices. Empirical models might be an interesting alternative to common condition factors to interpret clearly defined variables (e.g. the lipid or protein content) which are less blurred than “well-being” or “plumpness” (Hayes and Shonkwiler, 2001). However, such empirical models require further investigations and should include additional biological and environmental effects in order to be efficient in tropical tunas. Measuring biometric indices of condition in captive tunas under extreme conditions (e.g. starvation) may allow testing their sensitivity and range of potential values and eventually defining limit reference points. New condition factor, more adapted to “lean” fish should also be investigated.

CHAPITRE 7. COMPOSITION PROXIMALE DES TISSUS ET CONDITION DES INDIVIDUS

For example, bioelectrical impedance analysis (based on resistance and reactance of tissues to an electrical current) and Distell Fish Fatmeter[®] (based on an inverse relationship between water and lipid content in fish) have been shown to be useful to measure energy condition on temperate tunas (Willis and Hobday, 2008; Goñi and Arrizabalaga, 2010). Finally, the level of energy content is often discussed in studies using condition factors, but the quality of lipids and proteins can also greatly affect the organism health through essential nutrients (Arts and Kohler, 2009) and should probably be included for improving the reliability of health indicators.

Acknowledgments

We thank Aurélien Amiel and Hervé Guillou (UMR TOXALIM, Toulouse) for their help in biochemical analyses and Olivier Gauthier (UMR LEMAR, Brest) for advice in statistics. We wish also to thank all the SFA lab technicians and IOT Ltd staff for their help throughout the tuna sampling, as well as the IRD/SFA/IEO samplers and the fishermen for their help onboard purse-seiners. This work is a contribution to the projects EMOTION, CANAL, and ALECAP founded by ANR (ANR 11 JSV7 007 01), Thai Union Europe Group, and France Filière Pêche, respectively.

Chapitre 8

Influence des facteurs biologiques et environnementaux sur la composition en acide gras

Les lipides, et leurs composés les AG, sont la forme d'énergie la plus variable chez les thons tropicaux et peuvent constituer des réserves principalement dans le foie et le muscle rouge (chapitre 7). D'autre part, leurs sources varient au cours de la vie des individus et entre espèces, avec notamment une diminution de la proportion d'AGPI (Acides Gras poly-insaturés) avec la taille chez *Thunnus obesus* et *T. albacares* et une distribution tissulaire de certains AG dépendante du sexe chez *Katsuwonus pelamis* (chapitre 6). Bien que l'allocation d'un AG au niveau des membranes puisse varier dans une certaine mesure en réponse à sa disponibilité dans la nourriture (Copeman et al., 2002), la composition membranaire en AG est un processus largement régulé pour le maintien de l'homéostasie (McMurchie, 1988), et de nombreux AG sont donc mobilisés à cet effet. Ainsi, pour conserver ses fonctionnalités, la composition en AG de la membrane s'ajusterait aux conditions de température (théorie de l'homéoviscosité; Hazel, 1997) ou à l'activité métabolique de l'organisme (théorie "Pacemaker", Hulbert and Else, 1999) notamment grâce aux AGPI. Bien qu'indispensables, de nombreux AGPI ne peuvent cependant pas être synthétisés par les thons tropicaux et doivent être apportés par l'alimentation. On peut ainsi se demander dans quelle mesure l'évolution du régime alimentaire avec la taille ou le développement de certaines fonctions physiologiques (e.g reproduction) influencent la composition en AG des membranes, c'est-à-dire si cette composition est relativement conservée dans tous les tissus ou si au contraire elle est relativement plastique.

L'objectif de ce chapitre était donc de tester si les compositions en AG membranaires variaient entre espèces, ou au cours de différents processus biologiques (taille, sexe, maturité) et environnementaux (saison, habitat) afin de déterminer si certains AG sont particulièrement essentiels pour les thons tropicaux en milieu naturel. Dans ce chapitre, l'influence de la maturité a été considérée au travers de l'indice gonado-somatique, puisqu'il reflète bien l'investissement reproductif (chapitre 7).

Chez les trois espèces, les profils de distribution des AG entre fractions neutre et polaires et en entre les tissus sont globalement similaires, suggérant que les mécanismes impliqués dans l'hoéostasie sont relativement similaire entre ces espèces proches. En effet, les compositions en AG membranaires de quatre tissus (muscles blanc et rouge, foie et gonades) présentent certaines similitudes. Ainsi, dans les quatre tissus, quatre AG ont

CHAPITRE 8. INFLUENCE DES FACTEURS BIOLOGIQUES ET ENVIRONNEMENTAUX SUR LA COMPOSITION EN ACIDE GRAS

été retrouvés en proportion supérieure dans les lipides polaires que dans les lipides neutres : l'ARA, le DHA, le 22:5n-6 et le 18:0. La proportion de ces AG membranaires varie relativement peu dans le foie. En revanche, dans les muscles et les gonades, les proportions de DHA et ARA varient principalement avec la maturité, la taille et entre espèces. Bien que les proportions d'EPA dépendent aussi de ces facteurs biologiques, des niveaux similaires ont été observés dans les lipides polaires et neutres, suggérant une incorporation de l'EPA dans les membranes moins importante que celle du DHA et de l'ARA pour le maintien de l'homeostasie. La forte proportion dans les membranes de 18:0, un AGS synthétisé par les thons, a été attribuée à une distribution particulière des classes de phospholipides, notamment de phosphatidyl-serine et phosphatidyl-inositol. On note également de fortes proportions de 18:1n-9 dans les membranes cellulaires, suggérant un rôle de cet AGMI dans l'homéostasie. A l'inverse des lipides polaires, les proportions dans les lipides neutres des quatre AG précédemment évoqués varient fortement entre espèces et tailles dans le foie et les gonades mais peu dans les muscles, comme observé au chapitre 6. Ainsi, dans le muscle blanc, la proportion d'ARA dans les lipides neutres diminue au profit de celle des lipides membranaires jusqu'à environ 90 cm chez *T. obesus* et *T. albacares*.

Enfin, la variabilité inter-individuelle observée concernant les proportions de chaque AG dans les membranes des différents tissus suggère la possibilité d'une tolérance physiologique à la disponibilité en AG relativement développée chez les trois thons tropicaux. Toutefois, l'absence de relation entre les proportions des AG membranaires et les facteurs environnementaux (saisons, zone) pourrait être liée aux faibles contrastes thermiques qui existent entre ces facteurs dans l'océan Indien. Les capacités de plongées profondes et de thermorégulation partielle des thons suggèrent plutôt une adaptation thermique liée aux mouvements verticaux et non horizontaux.

Manuscrit D : soumis

Biological and environmental influence on tissue fatty acid compositions in wild tropical tunas

Fany Sardenne¹, Edouard Kraffe², Aurélien Amiel^{1,3}, Edwin Fouché^{1,3}, Laurent Debrauwer³, Frédéric Ménard⁴ & Nathalie Bodin¹

¹ IRD, UMR MARine Biodiversity Exploitation and Conservation (MARBEC), Victoria, SEYCHELLES.

² UBO, UMR Laboratoire des sciences de l'Environnement MARin (LEMAR), Brest, FRANCE

³ INRA, UMR Research Centre in Food Toxicology (TOXALIM), Toulouse, FRANCE.

⁴ IRD, UMR Mediterranean Institute of Oceanography (MIO), Marseille, FRANCE.

Key-words: biological membrane, essential fatty acids, PUFA, polar and neutral lipids, Western Indian Ocean, large pelagic fish.

8.1 Abstract

This study examined the fatty acid composition of three sympatric tropical tuna species (bigeye *Thunnus obesus*, yellowfin *T. albacares* and skipjack tuna *Katsuwonus pelamis*) sampled in the Western Indian Ocean throughout 2013. Specifically we explored and compared the fatty acid compositions of neutral and polar lipids, respectively involved in energy storage and cell membranes structure, in four tissues (red and white muscles, liver and gonads), according to biological (size, sex, maturity) and environmental (season, area) factors. The liver and the red muscle were the fattest tissues (i.e., higher levels of storage lipids) in the three species, whereas polar lipids were low in the white muscle. While species and tissues were important sources of differences in fatty acid compositions, limited influences of environmental factors were observed, except in hepatic cell membrane where fatty acids composition varied with monsoons. Docosahexaenoic acid (22:6n-3) constituted the major fatty acid in both lipid fractions, especially in muscles. Eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and oleic acid (18:1n-9) were in higher proportion in storage lipids than in polar lipids, while 22:6n-3 and arachidonic acid (20:4n-6), together with docosapentaenoic acid (22:5n-6) and stearic acid (18:0), showed preferential accumulation in structural lipids. 20:4n-6 was particularly involved in cell membranes of ovary and white muscle. A size influence was noted especially in yellowfin, where an increasing level of 20:4n-6 in cell membrane was observed in individuals > 90 cm. Overall, an important inter-individual variability in the fatty acid compositions of structural lipids was found within tissues despite the consideration of biological factors, suggesting the influence of individual specific behaviors on fatty acids profiles.

8.2 Introduction

Fatty acids (FA) play a major role in fish physiology. In marine ecosystems, n-3 and n-6 poly-unsaturated FA (PUFA) are constituents of complex lipids and influence growth, reproduction and survival (Koven et al., 1990; Arts et al., 2001). Among them, three highly-unsaturated FA are particularly important: docosahexaenoic acid (22:6n-3; DHA), eicosapentaenoic acid (20:5n-3; EPA) and arachidonic acid (20:4n-6; ARA). 22:6n-3 guarantees cell membrane characteristics as fluidity or permeability, while 20:5n-3 and 20:4n-6 are precursors of antagonist eicosanoids, i.e., hormone-like compounds, produced in response to extracellular stimuli (Tocher, 2003; Parrish, 2013). As eicosanoids are involved in immune response, 20:5n-3/20:4n-6 content in biological membranes can influence cell death and survival (Schmitz and Ecker, 2008). Although PUFA are physiologically vital, most marine fishes are not able to efficiently synthesize them due to lack of elongation and desaturation enzyme systems, and should acquire them from their diet (Tocher, 2003). Hence, marine fishes depend on dietary supply for several PUFA considered as essential (EFA; i.e., 18:3n-3, 18:2n-6, 20:4n-6, 20:5n-3 and 22:6n-3) (Arts et al., 2001). Most PUFA in aquatic food webs originate from phytoplankton and are transferred and concentrated through the food web (Parrish, 2009), inducing a potential bottom-up control on animal population (i.e., influence of lower trophic forms on the higher ones; Litzow et al., 2006; Werbrouck et al., 2016).

Once ingested, FA are stored generally without important modifications in neutral lipids (NL; mainly triacylglycerols), while they are inserted into biological membranes as polar lipids (PL; mainly phospholipids) according to tissues and cells' requirements (Tocher et al., 2008). FA composition of PL appears more regulated and generally differs from that of NL (Dalsgaard et al., 2003; Lands, 2009), because membranes are dynamic structures and a structural regulation is needed to maintain their functions (McMurchie, 1988).

Bigeye (BET; *Thunnus obesus*), yellowfin (YFT; *T. albacares*) and skipjack tuna (SKJ; *Kastuwonus pelamis*) are sympatric tropical tuna species widely exploited which display specific physiological capacities, e.g. "warm-blooded", ram ventilators and deep diving abilities (Graham and Dickson, 2004). However, these species present some differences in life-history traits: e.g., SKJ is smaller and sexually mature earlier than YFT and BET (Grande et al., 2012; Zudaire et al., 2013a). Considering FA, tuna species are known for their selective catabolism of 20:5n-3 relatively to 22:6n-3 (Ishihara and Saito, 1996; Scholefield et al., 2015), especially through mitochondria oxidation in heat-generating tissue (i.e., red muscle) (Mourete and Tocher, 2009). In tuna larvae, as in other vertebrate species, 22:6n-3 seems to be accumulated for development of neural tissues (Morais et al., 2011). Tunas also have a limited capacity for endogenous biosynthesis of long-chain PUFA (\geq C20) from C18 PUFA (Scholefield et al., 2015). Nevertheless, FA requirement for physiological functions in wild tropical tunas are still poorly documented, since most FA studies on these species focused on trophic relations (e.g Saito et al., 1996; Sardenne et al., submitted) or on nutritional interest for human consumption (e.g Medina et al., 1997; Peng et al., 2013).

Recently, by examining the FA composition of NL we hypothesized an ontogenic diet shift in the large tropical tunas (i.e., BET and YFT), leading to a decrease in the PUFA consumption to the benefit of mono-unsaturated FA (MUFA) (Sardenne et al., submitted). To improve our understanding of the implication of FA in wild tropical tunas' ecophysiology, our objectives were (i) to identify FA that are particularly involved in specific physiological functions (i.e., tissues); (ii) to determine if these FA are species-specific and/or vary with biological or environmental factors. For this purpose, we compared the FA composition of NL and PL in four tissues with different physiological functions: the liver, mainly involved in nutritional, synthesis and regulation functions; the gonads, which ensure the production of germinal cells; white muscle and red muscle, respectively used during fast-twitch and slow twitch. Then we tested influences of species, size, maturity,

sex, season and area on the level of the main FA in these tissues.

8.3 Material and methods

8.3.1 Tuna and tissue collection

A total of 55 BET, 59 SKJ and 54 YFT were collected throughout 2013 in the Western Indian Ocean at the unloading of purse seiners at Victoria, Seychelles. Fish selection was based on two criteria: (i) the capture date and area, according to the information provided by the purse-seine logbook, to cover possible seasonal changes; and (ii) tuna size, to examine ontogenetic changes. Two areas that differed in their oceanographic specificities (Longhurst, 2010) were considered thereafter: Mozambique Channel (MOZ) and Western-central Indian Ocean (WCIO; Figure 8.1). Four seasons were considered to account for the monsoon regime that affects the oceanographic conditions in the Indian Ocean: North-Eastern Monsoon (NEM) from mid-November to mid-March, Spring Inter-Monsoon (SIM) from mid-March to mid-May, South Western Monsoon (SWM) from mid-May to mid-September, and Autumn Inter-Monsoon (AIM) from mid-September to mid-November (Schott and McCreary Jr., 2001).

Selected individuals were processed at the laboratory, where fork length (FL; in cm, taken from the tip of the snout to the fork of the tail) and sex were recorded for each individual, except for sexually immature fish recorded as “indeterminate”. Gonad and somatic weights were also recorded to calculate a gonado-somatic index (GSI; $GSI = 100 * [\text{gonads weight} / \text{somatic weight}]$), used as a proxy of maturity. On each fish, fresh samples of around 2g were taken from dorsal white muscle (sampled under the dorsal spine on the left side), red muscle (under pectoral fin), liver and gonads (if enough developed) and stored at -80°C until further analyses.

8.3.2 Lipid extraction

FA composition of 1246 samples (including NL and PL) was determined in 623 tissues samples (137 gonads, 154 livers, 168 red muscles and 164 white muscles) after quantification of their NL and PL according to Sardenne et al. (submitted). Approximately 100 ± 0.1 mg ww of each tissue was weighed, crushed with 1 ml of methanol:EGTA (5 mM) (2/1, v/v) using a FastPrep System® (MP Biomedicals) and extracted with 2ml of dichloromethane:methanol (2:1, v/v). After addition of 1 ml of aqueous KCl (0.9% w/v), the extract was vortexed and centrifuged at 500 G for 10 min, allowing for the recovery of total lipid extract (TLE) in the lower organic phase.

8.3.3 Neutral and polar lipids quantification

An aliquot of TLE was spotted on quartz chromarods SIII (i.e., rods covered with silica) using a 5 μl air-tight glass syringe, and separated into lipid classes in a three-stage development system: (i) 25 min in 99:1:0.05 hexane/diethyl ether/formic acid; (ii) 40 min in 80:20:1 hexane/diethyl-ether/formic acid; then (iii) 15 min in pure acetone, followed by two folds 10 min in 5:4:1 chloroform/methanol/water (Parrish, 1999). Lipid classes were quantified after each separation stage using an Iatroscan MK-6s (Iatron Laboratories) thin-layer chromatography-flame ionization detector analyzer (TLC–FID). The signal was detected in millivolts and quantified using lipid standards with PeakSimple 3.93 software. Concentrations of PL (all phospholipids classes) and NL (sum of triacylglycerols, free FA, esterified sterols and wax esters) were determined and expressed in mg.g^{-1} on a wet weight basis (ww).

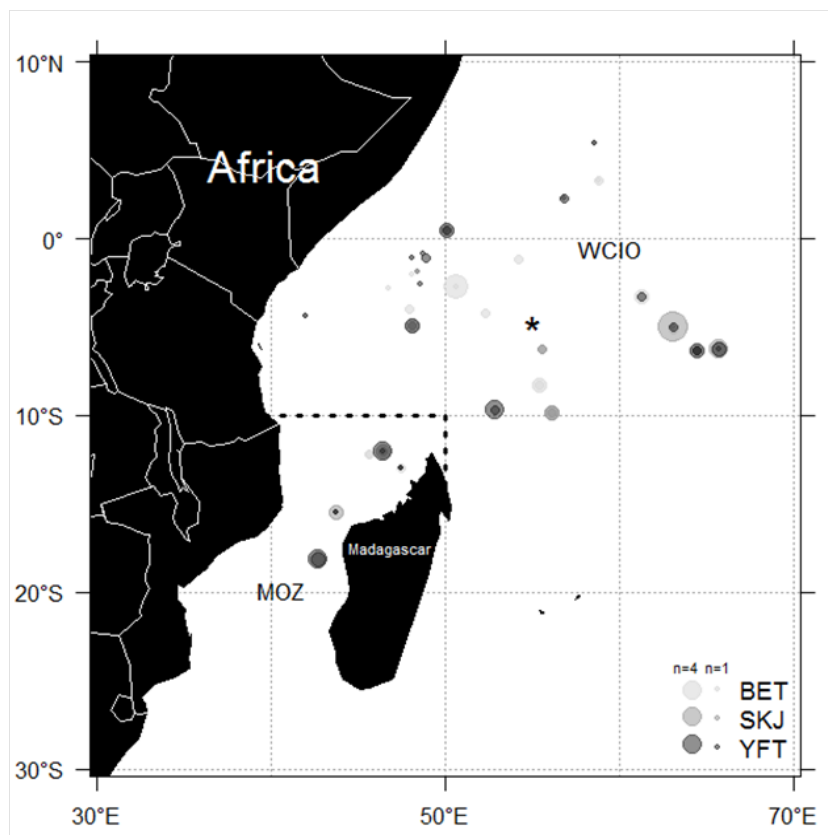


Fig. 8.1: Location of bigeye (BET), skipjack (SKJ) and yellowfin (YFT) caught in the Western Indian Ocean in 2013 and analyzed for fatty acid compositions. The limit of the two studied areas, Mozambique Channel (MOZ) and Western-Central Indian Ocean (WCIO) is indicated with dashed line. Star indicates Victoria port, Seychelles.

8.3.4 Fatty acids analyses

A second aliquot of TLE was separated into NL and PL fractions on pre-packed solid-phase silica columns (glass columns, Chromabond®, Macherey-Nagel), placed on a vacuum manifold. Approximately 100 µl of TLE were deposited on the column: NL were eluted with 2 ml of dichloromethane:methanol (98:2, v/v), then PL were eluted with 1 ml of dichloromethane: methanol (1:1, v/v) and 2 ml of ammonium acetate 0.2 M in methanol (Sardenne et al., submitted). After hydrolysis in KOH-methanol (0.5 M) for 30 min at 56°C, FA of both NL and PL were transmethylated for 60 min at 80°C after adding 1 ml of BF₃-Methanol 10% wt. Finally, FA methyl esters were analyzed on a TRACE 1310 gas chromatograph equipped with an on-column injector and a flame-ionization detector (GC-FID, Thermo Scientific) at the analytical platform MetaToul in Toulouse, France. Compounds were separated on a FAMEWAXTM column (30 m, 0.32 mm internal diameter, Restek) using helium as carrier gas at a constant flow of 15 ml.min⁻¹. The injector temperature was set at 225°C and the oven temperature was programmed from 130°C to 245°C at 2°C.min⁻¹ after a stationary phase at 130°C for 1 min. Peaks were identified by comparing sample retention times to those of commercial standard mixtures (Menhaden oil and Food Industry FAME Mix, Restek) with Xcalibur 2.2 software. Results were expressed in % as a relative abundance of total identified compounds. Finally, 23 FA accounting each in average >0.3% in one of the fraction (NL or PL) were kept for statistical analysis.

8.3.5 Data analyses

First, analyses of covariance (ANCOVA; F-tests) were used to test tissue-specific differences on PL and NL levels, and on EFA ratios, followed by pairwise Wilcoxon tests to precise differences among modalities.

Then principal component analyses (PCA) were used to graphically assess groups within the dataset and determining which FA best explained the discrimination between PL and NL in each tissue. After a scale transformation, F-tests followed by post-hoc t-tests were used to assess the respective influence of species, size, maturity (i.e., GSI), sex, season, area and of the interaction between species and size on the level of previously identified FA, in each tissue for both PL and NL following the model:

$T_i = Species_i * Size_i + GSI_i + Sex_i + Season_i + Area_i + \epsilon_i$, with T a FA level, i the fish, and ϵ the random noise term assumed to be normally distributed with mean zero and constant variance. The interaction between species and size was included mainly to overcome the inter-specific difference in maximum size. Pairwise Wilcoxon tests were also used to specify tissue-species differences in individual FA. Sampling design is detailed in table 8.1. Statistical analyses were performed using R 3.0.2 software.

		BET	SKJ	YFT
Number of individuals (total)		55	59	54
Sex	Indeterminate	14	10	16
	Female	21	25	19
	Male	20	24	19
Season	AIM	3	4	2
	NEM	19	16	5
	SIM	14	17	18
	SWM	19	22	29
Area	WCIO	48	45	41
	MOZ	7	14	13
Size in cm	range	29.5-160.8	30.0-78.5	29.0-157.0
	mean±SD	91.6±38.0	51.1±11.1	90.8±37.9
GSI	range	0-2.1	0-5.1	0-1.6
	mean±SD	0.3±0.4	2.0±1.3	0.4±0.4

Table 8.1: Sampling design showing the number, the size and the gonado-somatic index (GSI) of tuna sampled in the Western Indian Ocean throughout 2013 and analyzed for fatty acids composition. BET: Bigeye; SKJ: Skipjack; YFT: Yellowfin; AIM: Autumn Inter-Monsoon; NEM: North-Eastern Monsoon; SIM: Spring Inter-Monsoon; SWM: South Western Monsoon; WCIO: Western-Central Indian Ocean; MOZ: Mozambique Channel.

8.4 Results

8.4.1 Species and tissue-specific distribution of NL and PL in tropical tunas

ANCOVAs gave significant differences between tissues, species and their interaction in the levels of NL (all $p < 0.0001$, $F=126.2$, 23.7 and 7.4 , respectively) and PL (all $p < 0.001$, $F=186.9$, 28.2 and 4.4 , respectively). Levels of PL were lower in the white muscle ($2.1 \text{ mg.g}^{-1} \text{ ww}$) than in the other tissues that displayed similar levels, except for a slight difference between the red muscle ($6.7 \text{ mg.g}^{-1} \text{ ww}$) and the liver ($5.5 \text{ mg.g}^{-1} \text{ ww}$, $p < 0.0001$) (Figure 8.2). Similarly, levels of NL ranked liver ($8.0 \text{ mg.g}^{-1} \text{ ww}$) $>$ red muscle ($5.5 \text{ mg.g}^{-1} \text{ ww}$) $>$ gonads ($3.8 \text{ mg.g}^{-1} \text{ ww}$) $>$ white muscle ($0.7 \text{ mg.g}^{-1} \text{ ww}$; all $p < 0.0001$). In each tissue, differences were noted between species. In white muscle, both levels of NL and PL were lower in SKJ than in BET (both $p < 0.0001$) and YFT (both $p < 0.01$). BET and YFT showed similar levels ($p=0.47$ and $p=0.40$ for PL and NL respectively; Figure 8.2). In red muscle, similar levels of both PL and NL were observed between species, except a slightly lower level of PL in SKJ than in YFT ($p < 0.01$). Results were more contrasted in liver with levels of PL higher in BET ($p < 0.01$) than in YFT and SKJ ($p=0.35$) while the level of NL ranked YFT $>$ SKJ $>$ BET (all $p < 0.0001$). Analogous tendencies were noted in the gonads, with slightly higher levels of

CHAPITRE 8. INFLUENCE DES FACTEURS BIOLOGIQUES ET ENVIRONNEMENTAUX SUR LA COMPOSITION EN ACIDE GRAS

PL in BET than in SKJ ($p < 0.001$) while the level of NL was generally lower in BET than in YFT and SKJ ($p < 0.001$).

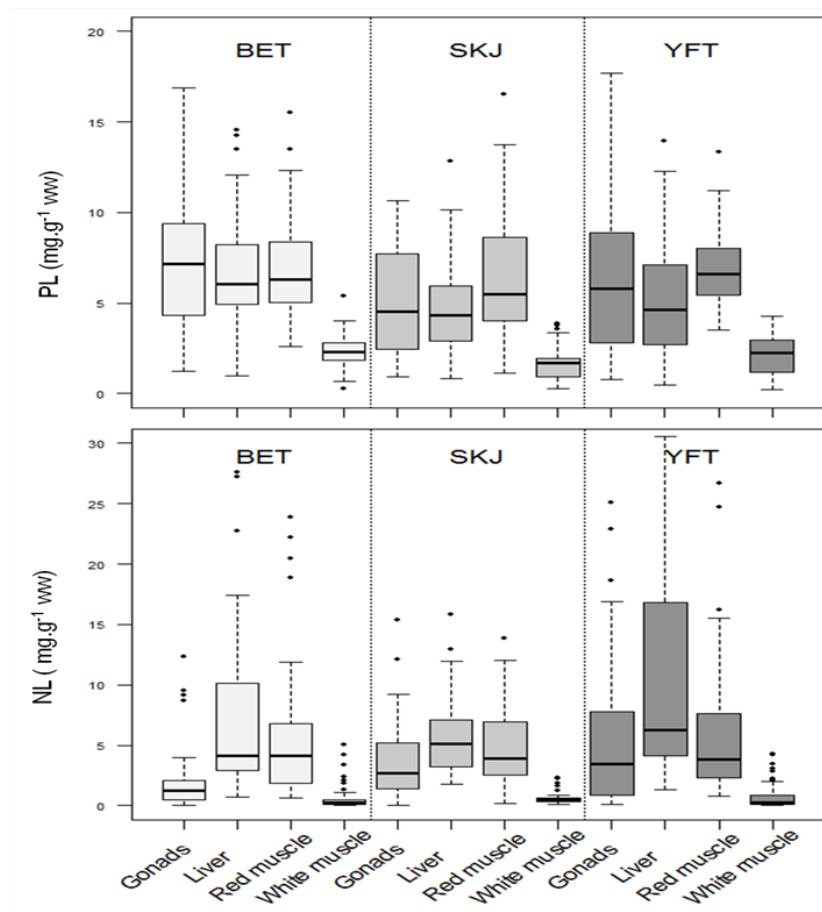


Fig. 8.2: Boxplots of the concentrations (in mg.g⁻¹ ww) of polar (PL) and neutral (NL) lipids in four tissues (gonads, liver, red and white muscles) of three tropical tunas (BET=bigeye; SKJ=skipjack; YFT=yellowfin) caught in 2013 in the Western Indian Ocean. The dots represent outliers.

8.4.2 Fatty acids of NL and PL

In the four tissues, graphical differences in PL and NL FA compositions were observed on the first components of PCAs, especially in the red muscle (37.3% of explained variability) (Figure 8.3). In all tissues and for the three species studied, 20:4n-6, 22:6n-3, 22:5n-6 and 18:0 were found in higher proportions in PL than in NL ($p < 0.001$ in the four tissues and for the four FA) (Table 8.2). 20:5n-3 and 18:1n-9 were mainly found in NL in gonads ($p < 0.0001$) and liver ($p < 0.0001$) respectively. Despite analogous patterns, 20:5n-3 and 18:1n-9 were less markedly discriminated between the two lipid fractions in the muscles ($p < 0.0001$ in the two muscles and for the two FA). Total MUFA were at higher levels in NL than in PL in all tissues, except in the white muscle ($p = 0.13$), while total PUFA (n-3 PUFA + n-6 PUFA) were in higher proportions in PL, except for gonads where total PUFA were higher in NL ($p < 0.0001$; Table 8.2).

In each tissue and species, EFA ratios strongly varied according to lipid fraction: 22:6n-3/20:5n-3 were higher in NL than in PL ($p < 0.0001$), while the opposite pattern was observed for 22:6n-3/20:4n-6 ($p < 0.0001$) and for 20:5n-3/20:4n-6 ($p < 0.0001$). In addition, in the three species EFA ratios were higher in the red muscle, in both NL and PL ($p < 0.0001$; Table 8.2) although not significant for 22:6n-3/20:5n-3 in PL (mean \pm SD=10.9 \pm 2.7, $p = 0.06$).

Table 8.2: Fatty acid composition (in % of total fatty acids in a given fraction) and fatty acid ratios (mean \pm SD of the total dataset) in neutral and polar lipids from four tissues (gonads, liver, red and white muscle) of three tropical tuna from the Western Indian Ocean. GSI=Gonado-somatic index. SFA: saturated fatty acids; MUFA: Monounsaturated fatty acids; PUFA: Polyunsaturated fatty acids. N=number of tissues analyzed for both neutral and polar lipids.

Species Tissue	Bigeye tuna (BE7)				Skipjack tuna (SKJ)				Yellowfin tuna (YFT)			
	Gonads	Liver	Red muscle	White muscle	Gonads	Liver	Red muscle	White muscle	Gonads	Liver	Red muscle	White muscle
N	45	50	55	53	49	55	59	57	43	49	54	54
NEUTRAL LIPIDS												
18:0	10.9 \pm 4.0	8.0 \pm 1.4	10.8 \pm 2.0	12.1 \pm 3.8	9.2 \pm 3.5	8.6 \pm 1.4	14.9 \pm 1.9	13.3 \pm 3.1	11.3 \pm 3.9	9.9 \pm 1.9	12.4 \pm 2.2	12.9 \pm 3.6
18:1n-9	15.1 \pm 3.2	18.7 \pm 8.0	15.8 \pm 3.8	14.2 \pm 4.9	10.4 \pm 2.6	9.4 \pm 4.3	10.1 \pm 2.2	8.1 \pm 2.1	13.5 \pm 2.8	17.3 \pm 9.3	12.7 \pm 2.8	12.4 \pm 4.3
20:4n-6 (ARA)	5.7 \pm 2.2	4.2 \pm 1.7	2.1 \pm 0.6	2.7 \pm 0.7	3.8 \pm 1.4	3.9 \pm 1.0	1.8 \pm 0.5	4.1 \pm 1.3	4.4 \pm 2.2	3.3 \pm 1.6	1.8 \pm 0.5	2.5 \pm 0.8
20:5n-3 (EPA)	4.6 \pm 1.3	4.6 \pm 1.5	3.0 \pm 0.7	3.7 \pm 0.9	4.9 \pm 1.6	5.7 \pm 1.7	3.2 \pm 0.7	5.2 \pm 1.2	4.2 \pm 0.9	4.0 \pm 1.7	2.9 \pm 0.8	3.7 \pm 1.0
22:5n-6	1.6 \pm 0.6	1.0 \pm 0.3	1.6 \pm 0.4	1.3 \pm 0.6	1.6 \pm 0.4	1.3 \pm 0.5	1.6 \pm 0.5	2.1 \pm 0.7	1.8 \pm 0.7	1.1 \pm 0.4	1.7 \pm 0.5	1.5 \pm 0.6
22:6n-3 (DHA)	19.2 \pm 6.8	15.6 \pm 5.3	22.6 \pm 6.9	18.7 \pm 5.8	23.1 \pm 6.9	20.7 \pm 6.7	26.0 \pm 5.7	23.3 \pm 6.6	18.4 \pm 6.1	14.7 \pm 5.7	22.9 \pm 7.4	20.0 \pm 7.7
SFA	41.7 \pm 9.2	42.8 \pm 5.2	40.6 \pm 7.1	47.1 \pm 9.3	45.3 \pm 8.6	49.2 \pm 7.9	45.2 \pm 6.1	49.0 \pm 9.7	45.7 \pm 8.9	47.4 \pm 6.0	44.1 \pm 7.5	46.6 \pm 10.9
MUFA	23.2 \pm 4.5	28.2 \pm 9.3	26.3 \pm 4.4	23.5 \pm 7.2	16.9 \pm 4.0	16.4 \pm 6.3	17.8 \pm 2.5	13.5 \pm 3.3	21.5 \pm 3.6	25.9 \pm 10.3	22.1 \pm 3.8	21.5 \pm 6.0
n-3 PUFA	25.5 \pm 8.1	21.7 \pm 6.6	27.2 \pm 7.6	23.4 \pm 6.5	30.0 \pm 8.2	27.5 \pm 7.9	30.8 \pm 6.2	29.1 \pm 7.5	24.5 \pm 7.5	20.3 \pm 7.4	27.6 \pm 8.2	25.1 \pm 8.6
n-6 PUFA	9.2 \pm 2.8	6.8 \pm 2.1	5.1 \pm 1.0	5.4 \pm 1.5	7.2 \pm 1.6	6.4 \pm 1.5	5.2 \pm 0.8	7.6 \pm 2.0	8.2 \pm 2.9	5.9 \pm 2.2	5.2 \pm 1.1	5.8 \pm 1.6
PUFA	34.7 \pm 9.5	28.6 \pm 8.2	32.3 \pm 8.2	28.8 \pm 7.4	37.2 \pm 9.3	33.9 \pm 8.9	35.9 \pm 6.7	36.8 \pm 8.9	32.7 \pm 8.5	26.1 \pm 9.4	32.8 \pm 9.1	30.9 \pm 9.8
ratios												
22:6n-3/20:5n-3	4.7 \pm 3.3	3.6 \pm 1.4	7.8 \pm 2.1	5.1 \pm 1.3	5.0 \pm 1.7	3.8 \pm 1.1	8.5 \pm 2.1	4.6 \pm 1.1	4.3 \pm 0.9	3.9 \pm 1.1	8.1 \pm 2.0	5.4 \pm 1.5
22:6n-3/20:4n-6	4.1 \pm 2.8	4.1 \pm 1.5	11.4 \pm 3.7	6.9 \pm 1.8	6.7 \pm 2.5	5.4 \pm 1.5	15.0 \pm 3.4	6.0 \pm 1.9	5.2 \pm 2.8	5.0 \pm 1.7	13.1 \pm 3.6	8.0 \pm 2.3
20:5n-3/20:4n-6	1.0 \pm 0.5	1.1 \pm 0.3	1.5 \pm 0.3	1.4 \pm 0.4	1.5 \pm 0.8	1.5 \pm 0.5	1.8 \pm 0.4	1.3 \pm 0.3	1.2 \pm 0.5	1.3 \pm 0.4	1.6 \pm 0.3	1.5 \pm 0.4
n-3 PUFA/n-6 PUFA	3.0 \pm 1.2	3.3 \pm 0.8	5.3 \pm 1.2	4.4 \pm 1.3	4.2 \pm 1.0	4.3 \pm 1.0	6.0 \pm 1.0	3.9 \pm 1.0	3.2 \pm 1.1	3.5 \pm 0.8	5.2 \pm 1.0	4.3 \pm 1.2
POLAR LIPIDS												
18:0	18.1 \pm 4.3	18.1 \pm 3.8	20.8 \pm 2.4	17.5 \pm 3.8	16.2 \pm 3.7	19.8 \pm 5.9	19.5 \pm 4.3	19.5 \pm 3.4	18.6 \pm 3.9	18.5 \pm 3.7	23.1 \pm 3.8	17.9 \pm 4.1
18:1n-9	12.3 \pm 2.2	7.7 \pm 2.7	13.0 \pm 3.4	11.7 \pm 3.5	8.9 \pm 2.5	5.1 \pm 2.0	9.4 \pm 2.5	16.1 \pm 6.6	11.8 \pm 2.4	8.0 \pm 3.7	11.3 \pm 2.5	12.3 \pm 3.1
20:4n-6 (ARA)	8.6 \pm 3.5	7.3 \pm 2.1	4.1 \pm 0.8	5.1 \pm 1.1	5.7 \pm 3.7	5.5 \pm 1.7	3.3 \pm 0.8	5.4 \pm 1.6	7.9 \pm 3.1	8.1 \pm 3.0	3.6 \pm 0.7	5.9 \pm 1.8
20:5n-3 (EPA)	3.2 \pm 1.3	3.5 \pm 0.7	2.5 \pm 0.6	2.7 \pm 0.6	3.5 \pm 1.9	3.4 \pm 0.8	2.7 \pm 0.5	2.6 \pm 0.6	2.9 \pm 1.0	3.7 \pm 1.3	2.5 \pm 0.6	3.0 \pm 0.6
22:5n-6	2.1 \pm 0.7	2.1 \pm 0.6	3.0 \pm 0.6	2.6 \pm 0.4	1.6 \pm 0.5	1.9 \pm 0.6	3.5 \pm 1.0	3.4 \pm 0.9	2.4 \pm 0.7	2.1 \pm 0.7	3.5 \pm 0.7	3.5 \pm 0.7
22:6n-3 (DHA)	13.8 \pm 4.7	23.4 \pm 6.5	26.8 \pm 5.1	29.9 \pm 5.1	22.4 \pm 6.0	25.9 \pm 7.6	33.0 \pm 6.9	26.7 \pm 8.3	14.9 \pm 3.5	23.8 \pm 6.8	24.5 \pm 5.3	29.0 \pm 6.0
SFA	53.0 \pm 6.5	49.0 \pm 7.4	39.5 \pm 5.2	42.1 \pm 5.8	52.1 \pm 9.5	51.2 \pm 9.6	41.4 \pm 8.2	40.7 \pm 9.8	52.6 \pm 5.4	47.5 \pm 8.7	41.7 \pm 5.8	38.2 \pm 7.3
MUFA	17.2 \pm 2.9	12.0 \pm 3.5	18.9 \pm 4.0	15.6 \pm 3.7	12.6 \pm 2.8	9.6 \pm 2.6	13.3 \pm 2.5	19.3 \pm 6.6	16.8 \pm 3.0	11.8 \pm 4.1	17.1 \pm 3.0	17.8 \pm 3.0
n-3 PUFA	17.8 \pm 5.6	28.0 \pm 7.1	30.4 \pm 5.5	33.2 \pm 5.6	26.8 \pm 7.5	30.3 \pm 8.2	36.5 \pm 7.2	29.9 \pm 8.8	18.7 \pm 4.1	23.0 \pm 7.9	28.4 \pm 5.8	32.7 \pm 6.6
n-6 PUFA	11.9 \pm 4.0	10.8 \pm 2.5	10.2 \pm 1.6	8.8 \pm 1.5	8.4 \pm 4.1	8.7 \pm 2.0	8.4 \pm 1.5	9.8 \pm 2.3	11.7 \pm 3.7	11.5 \pm 3.4	11.5 \pm 1.9	11.0 \pm 2.4
PUFA	29.7 \pm 7.6	38.8 \pm 8.8	40.7 \pm 6.5	42.0 \pm 6.0	35.2 \pm 10.8	39.0 \pm 9.3	44.9 \pm 8.2	39.7 \pm 9.1	30.4 \pm 6.4	40.4 \pm 10.8	39.9 \pm 6.6	43.7 \pm 7.4
ratios												
22:6n-3/20:5n-3	4.8 \pm 2.0	6.8 \pm 1.8	10.9 \pm 2.7	11.3 \pm 1.9	8.8 \pm 5.3	7.8 \pm 2.8	12.7 \pm 3.4	10.3 \pm 3.0	5.6 \pm 2.0	6.7 \pm 1.9	10.2 \pm 2.3	9.9 \pm 1.8
22:6n-3/20:4n-6	2.0 \pm 1.2	3.4 \pm 1.0	6.8 \pm 1.7	6.2 \pm 1.9	6.6 \pm 6.6	5.0 \pm 1.8	10.5 \pm 3.2	5.5 \pm 2.7	2.3 \pm 1.6	3.2 \pm 0.9	7.1 \pm 2.2	5.3 \pm 2.0
20:5n-3/20:4n-6	0.4 \pm 0.2	0.5 \pm 0.1	0.6 \pm 0.2	0.6 \pm 0.2	0.7 \pm 0.3	0.7 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2	0.5 \pm 0.2	0.4 \pm 0.2	0.5 \pm 0.1	0.7 \pm 0.2	0.5 \pm 0.2
n-3 PUFA/n-6 PUFA	1.7 \pm 0.7	2.6 \pm 0.5	3.0 \pm 0.5	3.9 \pm 0.9	3.7 \pm 1.5	3.6 \pm 0.8	4.4 \pm 0.8	3.2 \pm 1.2	1.8 \pm 0.7	2.6 \pm 0.5	2.5 \pm 0.6	3.1 \pm 0.9

CHAPITRE 8. INFLUENCE DES FACTEURS BIOLOGIQUES ET ENVIRONNEMENTAUX SUR LA COMPOSITION EN ACIDE GRAS

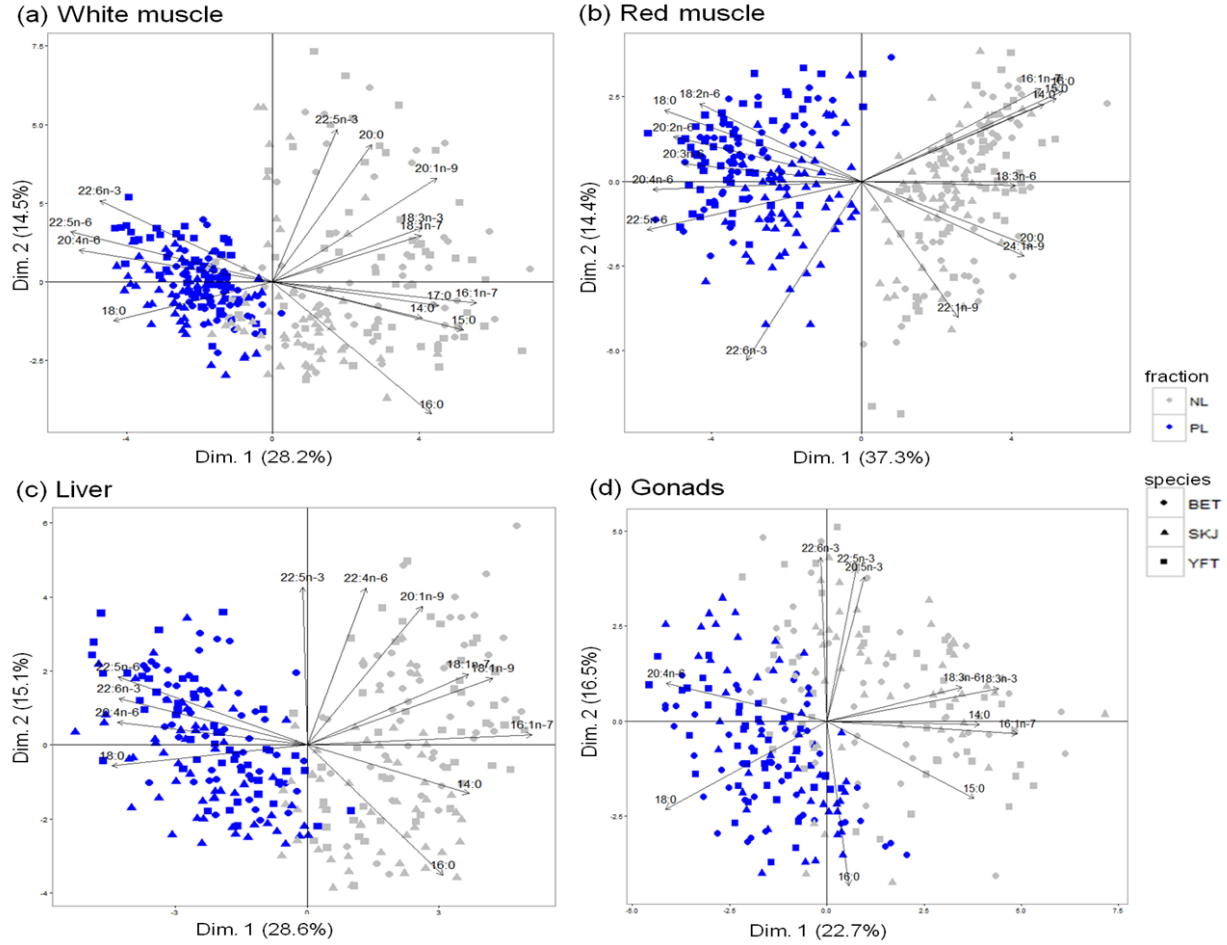


Fig. 8.3: Principal component analyses of neutral and polar fatty acids' percentage composition for four tissues of three tropical tuna (BET= bigeye; SKJ=skipjack; YFT=yellowfin) sampled in the Western Indian Ocean during 2013. Only fatty acids with $\cos^2 > 0.35$ were represented to improve the reading.

8.4.3 Sources of variation of fatty acids of PL

According to PCA results, we focused here on six individual FA (i.e., 22:6n-3, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:5n-6, 18:0 and 18:1n-9). The influence of biological (species, size, GSI, sex) and environmental (season, catch location) factors and the size-species interaction varied according to tissue and individual FA in PL (Table 8.3).

Species was a strong discriminating factor in muscles and gonads. The most notable differences were found in the red muscle where levels of 22:6n-3 were higher in SKJ than in BET and YFT ($t=3.9$, $p<0.001$ and $t=-1.5$, $p=0.13$, Figure 8.4) while in gonads, this FA was in slightly lower proportion in BET than in the two other species ($t=-2.1$, $p<0.05$). The level of 22:6n-3 in the white muscle was higher in both BET and YFT ($t=-0.6$, $p=0.55$) than in SKJ ($t=-2.5$, $p<0.05$; Table 8.2) whereas the opposite pattern was observed for 18:1n-9 (higher levels in SKJ: $t=4.6$, $p<0.0001$). In both muscles, 22:5n-6 was higher in YFT and SKJ ($3.5\pm0.8\%$ in both muscles) than in BET ($2.6\pm0.5\%$ and $3.0\pm0.6\%$ in white and red muscles respectively; both $p<0.001$; Figure 8.4). Post-hoc tests gave inter-specific differences in 18:0 only in the red muscle, with YFT ($23.1\pm3.8\%$) > BET ($20.8\pm2.4\%$) > SKJ ($19.5\pm4.3\%$, all $p<0.05$).

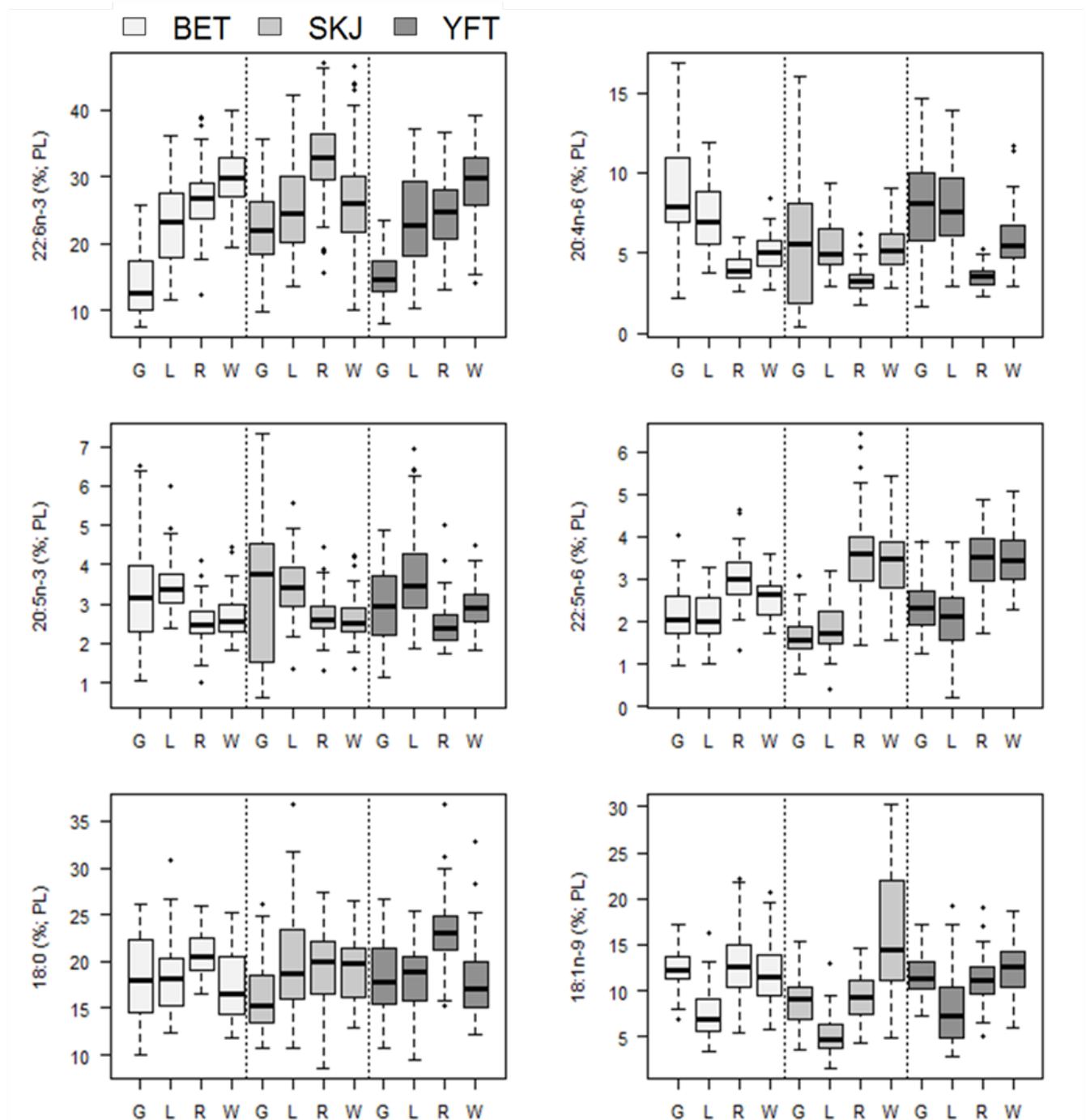
Fish size influenced the three EFA and 18:1n-9 in the white and red muscle and in a lesser extent in

Table 8.3: F-test results for analysis of the influence of various factors (species, size and their interaction, GSI, sex, season, area) on six FA (22:6n-3, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:5n-6, 18:0 and 18:1n-9) from the polar lipids (PL) in four tissues of three tropical tuna from the Western Indian Ocean. F=statistic of the test; p=p-value. GSI=Gonado-somatic index.

		22:6n-3	20:4n-6	20:5n-3	22:5n-6	18:0	18:1n-9
<i>White muscle (n=164)</i>							
Species	F	4.7	5.2	6.4	34.1	4.8	18.4
	p	0.010	0.007	0.002	0.000	0.010	0.000
Size	F	27.9	56.5	9.4	3.0	1.1	7.2
	p	0.000	0.000	0.003	0.086	0.301	0.008
GSI	F	25.9	1.7	4.7	1.9	1.4	3.2
	p	0.000	0.198	0.032	0.173	0.246	0.070
Sex	F	4.4	3.2	4.3	0.2	2.7	4.9
	p	0.014	0.045	0.015	0.814	0.069	0.009
Season	F	1.7	1.3	2.2	2.6	2.1	4.1
	p	0.179	0.279	0.091	0.057	0.108	0.008
Area	F	0.2	2.7	0.1	0.9	0.6	2.9
	p	0.660	0.105	0.823	0.332	0.440	0.090
Species × Size	F	5.5	2.7	4.1	3.4	2.5	8.4
	p	0.005	0.072	0.019	0.035	0.083	0.000
<i>Red muscle (n=168)</i>							
Species	F	33.4	20.1	3.0	7.7	15.1	36.6
	p	0.000	0.000	0.050	0.001	0.000	0.000
Size	F	4.1	20.9	23.4	1.2	3.1	78.3
	p	0.044	0.000	0.000	0.275	0.079	0.000
GSI	F	1.5	1.3	3.1	0.1	0.0	7.1
	p	0.230	0.252	0.081	0.781	0.929	0.009
Sex	F	1.6	12.2	2.8	1.9	3.0	1.0
	p	0.200	0.000	0.065	0.157	0.055	0.356
Season	F	0.5	2.2	16.2	3.0	0.9	1.9
	p	0.673	0.096	0.000	0.032	0.458	0.126
Area	F	2.2	1.0	0.4	0.0	2.5	0.1
	p	0.139	0.311	0.508	0.876	0.115	0.792
Species × Size	F	2.7	5.9	3.9	7.6	4.4	6.2
	p	0.067	0.003	0.023	0.001	0.013	0.002
<i>Liver (n=154)</i>							
Species	F	1.9	18.9	1.6	2.3	2.0	17.1
	p	0.148	0.000	0.210	0.103	0.140	0.000
Size	F	0.9	1.2	6.0	5.1	1.1	11.6
	p	0.343	0.275	0.016	0.026	0.296	0.000
GSI	F	0.2	0.3	1.1	0.1	14.3	0.4
	p	0.669	0.572	0.296	0.788	0.000	0.541
Sex	F	0.3	3.0	2.4	0.7	0.2	0.8
	p	0.750	0.053	0.092	0.515	0.837	0.444
Season	F	3.2	4.5	2.8	4.5	2.4	0.5
	p	0.024	0.005	0.043	0.005	0.071	0.688
Area	F	3.4	0.1	0.3	0.3	4.9	0.5
	p	0.069	0.729	0.586	0.575	0.028	0.491
Species × Size	F	1.4	2.2	3.9	0.9	2.3	1.5
	p	0.252	0.119	0.023	0.408	0.103	0.229
<i>Gonads (n=137)</i>							
Species	F	44.7	12.1	2.2	18.8	6.2	32.2
	p	0.000	0.000	0.119	0.000	0.003	0.000
Size	F	7.3	9.2	14.2	0.1	48.8	0.4
	p	0.008	0.003	0.000	0.786	0.000	0.522
GSI	F	0.0	2.0	0.9	3.2	1.6	1.4
	p	0.908	0.161	0.340	0.077	0.204	0.246
Sex	F	3.6	12.5	15.1	1.1	1.4	5.2
	p	0.030	0.000	0.000	0.350	0.254	0.007
Season	F	1.2	5.0	0.5	2.2	3.1	2.4
	p	0.316	0.003	0.654	0.095	0.030	0.069
Area	F	0.3	0.0	0.2	5.5	1.8	6.1
	p	0.595	0.966	0.627	0.020	0.181	0.015
Species × Size	F	1.7	1.0	3.6	0.0	0.4	0.6
	p	0.178	0.357	0.030	0.958	0.640	0.552

CHAPITRE 8. INFLUENCE DES FACTEURS BIOLOGIQUES ET ENVIRONNEMENTAUX SUR LA COMPOSITION EN ACIDE GRAS

Fig. 8.4: Boxplots of some individual FA proportions in polar lipids (PL) of gonads (G; n=45, 49 and 43 in BET, SKJ and YFT respectively), liver (L; n=50, 55 and 49), red muscle (R; n=55, 59 and 54), white muscle (W; n=53, 59 and 54) in three tropical tunas from the Western Indian Ocean (BET, bigeye; SKJ, skipjack; YFT, yellowfin). The dots represent outliers.



the gonads. 20:4n-6 increased with size in both muscles ($t=2.7$, $p<0.001$ and $t=2.2$, $p<0.05$ in white and red muscle respectively; Figure 8.5), especially in SKJ, whereas the 22:6n-3 decrease with size in the white muscle of SKJ ($t=-3.3$, $p<0.01$). The levels of 20:5n-3 and 18:0 decreased with size in the red muscle and the gonads, respectively (Table 8.3). In contrast, levels of 18:1n-9 increase with size in red muscle ($t=6.7$, $p<0.0001$) and in liver ($t=3.2$, $p<0.01$).

Sex mainly influenced the levels of 20:4n-6, 22:6n-3, 20:5n-3 and 18:1n-9 (Table 3), but no influence was noted in the liver. In the red muscle, levels of 20:4n-6 were slightly lower in indeterminate ($3.1\pm0.6\%$) than in male and female ($3.8\pm0.9\%$, $t=-4.5$, $p<0.001$), but higher in gonads of indeterminate and female ($8.5\pm3.1\%$, $t=-0.5$, $p=0.61$) than in testis ($5.8\pm3.8\%$, $t=-4.9$, $p<0.001$). In contrast, levels of 18:1n-9 were higher in testis than in ovary ($t=2.3$, $p<0.05$).

GSI had a limited influence on FA levels in all tissues, with the exception of 22:6n-3 that decreased with GSI ($t=-2.3$, $p<0.05$) in the white muscle, and the level of 18:0 that increased with GSI in liver ($t=3.5$, $p<0.001$).

Season mainly influenced the levels of FA in the liver: 22:6n-3, 20:4n-6, 20:5n-3 and 22:5n-6 varied according to the fishing season, such as levels of 22:6n-3 that ranked SIM ($26.1\pm7.3\%$) > NEM ($24.0\pm6.0\%$) > SWM ($23.9\pm7.3\%$) > AIM ($19.3\pm4.9\%$; all $p<0.05$). In the red muscle, levels of 20:5n-3 were high in animal caught during AIM ($3.7\pm0.6\%$ vs. $2.5\pm0.5\%$ in the others seasons, $t=-6$, $p<0.001$) and in the white muscle, levels of 18:1n-9 were higher during AIM than SWM ($t=-2.6$, $p<0.05$). In contrast, levels of 22:5n-6 were lower in all tissues during AIM than SWM ($t=2.4$, $t=3.4$, $t=2.3$, all $p<0.05$ in red muscle, liver and gonads, respectively). Slight seasonal influences were also observed on 20:4n-6 and 18:0 in the gonads, but differences should be looked with regard to the unbalanced sampling among seasons (Table 8.1).

Almost no influence of the sampling area was detected (Table 8.3), except a slight effect on 22:5n-6 in the gonads and on 18:0 in the liver (slightly higher in fish from MOZ; $t=-2.3$, $p<0.05$ and $t=-2.1$, $p<0.05$, respectively).

8.4.4 Sources of variation of fatty acids in NL

As for PL, the extent of the variability in FA of NL depended mainly on species (Table 8.4). Differences among species were mainly detected in muscles. However, no inter-specific differences in EFA were detected in white muscle, and post-hoc tests gave any difference in 22:3n-6 proportions among species in liver. In gonads, the 22:6n-3 levels were higher in SKJ than in the other species ($t=3.3$, $p<0.01$; Table 8.2). In white muscle, the levels of 22:5n-6 ranked SKJ > YFT > BET ($t=2.5$ and 2.2 , $p<0.05$), whereas the opposite pattern was observed for 18:1n-9 ($t=-3.2$ and $t=-3.8$, $p<0.01$). The levels in 18:0 were higher in SKJ than in the two other species, in white ($t=2.4$, $p<0.05$) and red ($t=3.8$, $p<0.001$) muscles, but ranked YFT > SKJ > BET ($t=5.8$ and 2.2 , $p<0.05$) in the liver. The influence of fish size was mainly detected in gonads: the levels of 22:6n-3 and 22:5n-6 increased in gonads ($t=3.3$, $p<0.01$ and $t=3.6$, $p<0.0001$, respectively), whereas 18:0 decreased with size in red muscle ($t=-2.0$, $p<0.05$), as the 20:5n-3 in liver ($t=-2.3$, $p<0.05$). Differences among sexes remained minor in NL (Table 8.4): in the liver, slightly higher levels of 20:4n-6 were noted in the adults ($3.8\pm1.6\%$) than in indeterminate fish ($3.6\pm1.2\%$; $t=-2.8$, $p<0.01$), and levels of 22:5n-6 were higher in males ($1.3\pm0.5\%$) than in females and indeterminates ($1.1\pm0.4\%$; $t=4.3$, $p<0.001$). With GSI, the levels of 20:4n-6 and 18:0 decreased in gonads (both $t=-3.4$, $p<0.001$) while 18:1n-9 increased ($t=2.8$, $p<0.01$). Seasonal influences were observed in muscles and liver: among seasons, minor changes (all less than 1%) were observed for 20:4n-6 and 18:0 in red muscle and for 20:5n-3 in liver. Post-hoc test gave no difference of 18:1n-9 levels among seasons. The influence of area was detected mainly in red muscle and liver: the levels

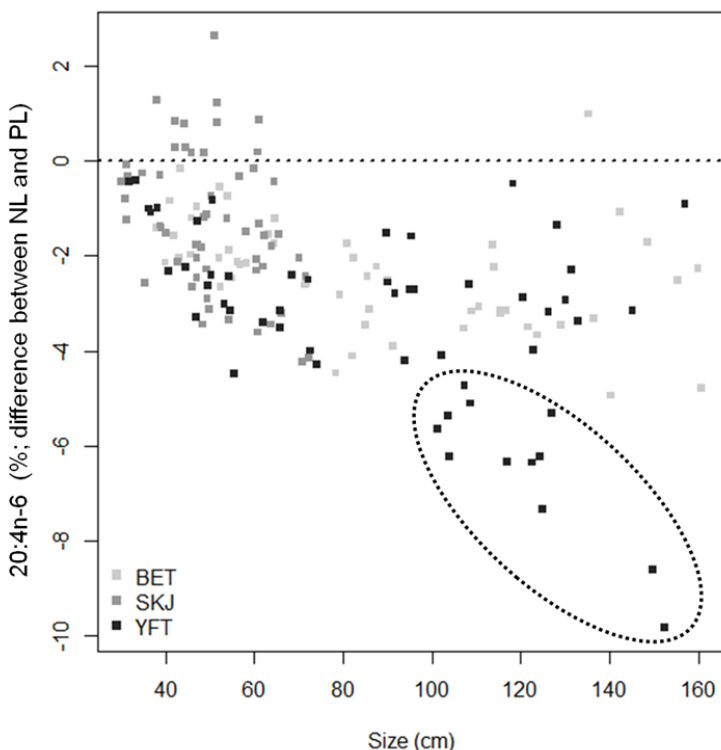


Fig. 8.5: Differences between 20:4n-6 percentages in neutral lipids (NL) and polar lipids (PL) according to size, in the white muscle of three tropical tunas from the Western Indian Ocean (BET, bigeye; SKJ, skipjack; YFT, yellowfin). Above the dashed line, ARA levels were higher in NL than in PL and below they were higher in PL. The dashed ellipse indicates large YFT with levels of 20:4n-6 particularly higher in PL than in NL.

of 22:6n-3 were lower in red muscle of fish from MOZ ($22.5 \pm 5.4\%$) than from WCIO ($23.9 \pm 7.0\%$; $t=2.1$, $p<0.05$). In contrast, in liver, 22:6n-3 was higher in MOZ ($19.9 \pm 7.0\%$) than in WCIO (16.1 ± 6.0 ; $t=-2.5$, $p<0.05$). Levels of 18:1n-9 were also higher in gonads of fish from WCIO than from MOZ ($13.4 \pm 3.4\%$ vs. $10.7 \pm 2.7\%$; $t=5.2$, $p<0.0001$), despite similar mean GSI in the two areas ($W=33419$, $p=0.51$).

8.5 Discussion

To improve knowledge on tropical tuna's ecophysiology, we compared FA composition between biological membranes (PL) and storage lipids (NL), in four tissues with different physiological functions. This allowed to identify four FA (22:6n-3, 20:4n-6, 22:5n-6 and 18:0) selectively incorporated in PL, and two FA (20:5n-3 and 18:1n-9) preferentially incorporated in NL. The extent of the specific association of FA with PL varied mainly among tissues and according to species and size, except in the liver. The sexual maturity (i.e., GSI) did not greatly influence the levels of these FA in PL, even in gonads. Environmental factors (season and area) had limited influence on the levels of FA in the PL in muscles, while they affected the levels of these same FA in PL and NL of liver.

8.5.1 Structural and storage lipids in tropical tunas

Tropical tunas and especially SKJ are relatively lean fishes as displayed by their low concentrations of NL in the white muscle, the main tissue in weight (more than 50% of total body weight; Graham et al., 1983). Lower concentrations of PL in the white muscle than in the other tissues were unexpected. However, a lower membrane surface might be linked to a relatively larger cells' size and/or to a lower number of organelles. Indeed, George and Stevens (1978) observed that white fibers have a large diameter (in average 66 μm for 35

Table 8.4: F-test results for analysis of the influence of various factors (species, size and their interaction, GSI, sex, season, area) on six FA (22:6n-3, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:5n-6, 18:0 and 18:1n-9) from the neutral lipids (NL) in four tissues of three tropical tuna from the Western Indian Ocean. F=statistic of the test; p=p-value. GSI=Gonado-somatic index.

		22:6n-3	20:4n-6	20:5n-3	22:5n-6	18:0	18:1n-9
<i>White muscle (n=164)</i>							
Species	F	7.4	42.6	41.2	22.4	2.0	43.5
	p	0.001	0.000	0.000	0.000	0.137	0.000
Size	F	10.7	1.1	2.5	0.0	19.2	23.5
	p	0.001	0.290	0.119	0.858	0.000	0.000
GSI	F	0.3	6.6	0.2	0.3	3.4	0.2
	p	0.590	0.011	0.634	0.562	0.669	0.657
Sex	F	1.0	1.3	2.9	1.2	1.7	0.4
	p	0.354	0.289	0.061	0.311	0.191	0.667
Season	F	2.2	0.7	3.7	0.6	3.4	2.6
	p	0.095	0.579	0.125	0.620	0.019	0.045
Area	F	0.2	0.3	0.4	0.3	2.5	3.1
	p	0.688	0.568	0.543	0.601	0.117	0.078
Species × Size	F	0.3	0.2	1.1	0.5	2.7	4.4
	p	0.708	0.859	0.351	0.614	0.073	0.014
<i>Red muscle (n=168)</i>							
Species	F	4.6	7.3	2.5	1.3	70.7	67.1
	p	0.012	0.001	0.084	0.266	0.000	0.000
Size	F	0.1	9.5	1.4	1.0	16.6	39.6
	p	0.815	0.002	0.247	0.313	0.000	0.000
GSI	F	0.0	1.1	0.0	0.0	2.1	1.2
	p	0.993	0.300	0.863	0.879	0.153	0.272
Sex	F	0.2	0.2	0.3	1.4	0.1	2.0
	p	0.824	0.849	0.770	0.258	0.930	0.141
Season	F	1.4	7.9	4.8	1.9	6.3	0.9
	p	0.232	0.000	0.003	0.139	0.000	0.439
Area	F	4.5	1.9	2.0	0.4	4.3	0.2
	p	0.036	0.166	0.156	0.511	0.040	0.629
Species × Size	F	0.1	8.1	3.0	1.0	3.2	0.9
	p	0.944	0.000	0.055	0.380	0.044	0.411
<i>Liver (n=154)</i>							
Species	F	17.2	5.7	17.2	8.9	19.0	28.4
	p	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000
Size	F	9.2	3.5	20.0	6.5	0.2	13.9
	p	0.003	0.062	0.000	0.012	0.681	0.000
GSI	F	0.0	0.1	4.5	0.1	1.0	0.3
	p	0.857	0.757	0.035	0.722	0.314	0.573
Sex	F	2.8	5.0	5.3	10.6	0.1	2.0
	p	0.067	0.008	0.006	0.000	0.928	0.140
Season	F	1.1	2.4	4.4	3.2	1.6	4.1
	p	0.354	0.070	0.006	0.026	0.190	0.008
Area	F	6.3	2.1	0.1	4.5	8.9	2.5
	p	0.013	0.152	0.795	0.035	0.003	0.114
Species × Size	F	1.7	5.1	2.0	2.1	1.4	0.8
	p	0.183	0.007	0.134	0.124	0.250	0.434
<i>Gonads (n=137)</i>							
Species	F	9.8	12.2	3.3	2.4	5.9	46.5
	p	0.000	0.000	0.041	0.093	0.004	0.000
Size	F	33.6	5.3	5.9	25.1	35.4	1.2
	p	0.000	0.022	0.016	0.000	0.000	0.271
GSI	F	0.5	13.0	3.4	0.4	27.2	14.8
	p	0.489	0.000	0.067	0.554	0.000	0.000
Sex	F	2.6	5.8	0.6	0.5	3.4	6.6
	p	0.081	0.004	0.557	0.629	0.035	0.002
Season	F	0.1	0.9	0.6	2.2	2.3	1.5
	p	0.959	0.449	0.644	0.091	0.078	0.229
Area	F	0.2	4.5	0.5	4.3	4.6	25.0
	p	0.648	0.036	0.488	0.041	0.034	0.000
Species × Size	F	1.5	0.4	0.7	0.1	1.4	1.4
	p	0.219	0.678	0.495	0.892	0.240	0.242

CHAPITRE 8. INFLUENCE DES FACTEURS BIOLOGIQUES ET ENVIRONNEMENTAUX SUR LA COMPOSITION EN ACIDE GRAS

μm in red muscle) and a low number of mitochondria in comparison to red muscle. On the opposite, the liver could act as a fat depot organ. In YFT, a large extent and inter-individual variability in the NL level was found in this organ. Zudaire et al. (2014) observed triacylglycerol storage in liver before reproduction related to the income-capital breeding strategy for this species. In contrast, SKJ was characterized as an income breeder with indeterminate fecundity, i.e., which reinvest the majority of its acquired energy to reproduction without storage period, and breeding all year round (Grande et al., 2014). This may explain a lower variability of NL content in the liver of SKJ compared to YFT. On the other hand, we observed an increase of NL content in gonads with GSI only in SKJ (data not shown), suggesting a large energy allocation to reproduction in this species. Only few information is available concerning reproductive strategy of BET, and an under-representation of late maturing individuals in the sampling design restricted our interpretation, as only two have a GSI over 1.2 (one male and one female). However, the extent of NL in the liver of BET reached that of YFT when considering the three extreme points, suggesting an energy allocation to reproduction similar between these two species (i.e., income-capital breeding strategy). Finally, differences between genders in the level of reproductive investment were observed in the three species, with females provided more lipid energy and protein than male to gonads (Sardenne et al., submitted). The red muscle also appeared as a potential fat depot. Its lipid metabolism consumes FA through β -oxidation in mitochondria (Dickson, 1996), and could suggest a greater need of FA in fat depots in this highly oxidative tissue.

8.5.2 Fatty acid distribution in structural and storage lipids

The higher levels of 20:4n-6 in PL of the four tissues in the three species studied suggest an important role of this FA for numerous physiological functions, as already described for other marine fishes (Bell and Sargent, 2003; Anholt et al., 2004; Koussoroplis et al., 2011). Requirements of 20:4n-6 in PL also seem to increase with ontogeny as its selective incorporation in PL increased with size in white muscle (Figure 8.5) as well as in adult stages compared to immature fish in this tissue. Several physiological parameters changed with size (e.g. reproductive investment, dive capacities, age...) and in the present study, it was not possible to specify the origin of these increasing needs in muscles. Testis showed lower levels of 20:4n-6 than ovaries suggesting higher needs associated to reproduction in female gonads, through prostaglandins for example (Sorbera et al., 2001). For comparison, in walleye *Sander vitreus*, the size increase in females is associated with higher 22:6n-3 and 20:4n-6 allocation towards eggs, to the detriment of 20:5n-3 (Wiegand et al., 2004). This emphasizes the potential important role of 20:4n-6 in tropical tuna reproduction. However, details in reproductive stages would be necessary to conclude properly about the role of this FA: for example the level of 20:4n-6 in *T. thynnus* ovaries decreased between early and late oocyte developmental stages (Mourente et al., 2001).

As previously observed, 22:6n-3 was highly retained in tuna PL (Tocher, 2003). Nevertheless, the present study showed that this specificity was higher in muscles than in gonads and liver. Interestingly, in larger and deep-diver species (i.e., BET and YFT), proportions of 22:6n-3 in the PL of red muscle were lower than in SKJ, suggesting different inter-specific adaptations linked to the 22:6n-3 in this heat productive tissue. Similarly, in gonads, levels of 22:6n-3 were lower in BET and in YFT than in SKJ. This could suggest differences in 22:6n-3 requirement for reproduction, related to differences in reproductive strategies already known for these species (i.e., income vs. income-capital breeder, Zudaire et al., 2013b; Grande et al., 2012). Physiological role of 22:5n-6 in fish is much less documented probably because it is generally found in low levels (Cejas et al., 2004). However, significant amount of 22:5n-6 was already found in the white muscle of YFT and SKJ (3.3–4.3% of total FA; Bodin et al., 2014). The comparison between NL and PL allowed

to show that 22:5n-6 was particularly retained in PL of white and red muscles (close to levels of 20:5n-3). In mammals, a high concentration of n-6 PUFA in PL increased the activity of the Ca^{2+} -ATPase in the sarcoplasmic reticulum involved in muscular contraction (Swanson et al., 1989), allowing for higher running speeds (Arnold et al., 2015) and suggesting a higher requirements of 22:5n-6 for white and red muscles' activity. *De novo* synthesis of 22:5n-6 from 20:4n-6 occurs in some marine fish through elongase and $\Delta 4$ -desaturase (Li et al., 2010). However, in *T. maccoyii* and possibly in the other *Thunnus*, such pathway was reported to be minor (Scholefield et al., 2015) 22:5n-6 being mainly stemmed from diet in these species. Mourente and Tocher (2009) suggested that tunas have low capacity of *de novo* synthesis of long-chain PUFA, because their relatively high trophic position allowed them sufficient assimilation.

Relatively to 22:6n-3 and 20:4n-6, 20:5n-3 was slightly incorporated within PL of the four studied tissues, suggesting relatively lower needs of this FA for cell membrane homeostasis. Interestingly, in NL, the levels of 20:5n-3 varied among tissues with the lowest levels found in the red muscle. This could support the assumption of Tocher (2003) who noted that tuna species have a selective catabolism of 20:5n-3 relatively to 22:6n-3, and suggested that 20:5n-3 could readily be oxidized by mitochondria in heat-generating tissues (i.e., red muscle). Similarly, Scholefield et al. (2015) observed on a cell line of *T. maccoyii* a substantial β -oxidation of 20:5n-3 and 18:3n-3, but much less activity towards 18:0, 18:1n-9 or 18:2n-6. On the other hand, the large inclusion of 18:1n-9 into PL, especially in muscles (e.g., up to $16.1 \pm 6.6\%$ for 18:1n-9 in the PL of white muscle in SKJ), suggested this FA is largely involved in the cellular homeostasis of muscles such as homeoviscous adaptation to temperature-shifts in these species displaying a regional endothermy (Hazel, 1997; Graham and Dickson, 2004). Nevertheless, by comparing FA in NL and PL lipids, it was found that for gonads and liver, 18:1n-9 was preferentially associated to NL. Actually, spawning periods, physiological functions or environmental conditions among others, could favor a selective mobilization and oxidation of FA (Budge et al., 2011), and 18:1n-9 from NL has been reported to be oxidized for metabolic energy production in tuna eggs and larvae (Ortega and Mourente, 2009).

8.5.3 Inter-individual variability and ecophysiological implication

Relatively large inter-individual variability was observed in each species and in the four tissues (e.g. SD up to 8.3% for DHA in the PL of white muscle). Part of this variability was explained by differences in fish size that could correspond to physiological modifications with size/age. Diet shifts at around 90-100 cm FL were observed in YFT and BET (Sardenne et al., submitted) and inter-individual variability of FA composition of PL and NL linked to size could correspond to a diet differences between individuals. Indeed, feeding on a single FA source for a long time influences the FA composition of PL in predators (Regost et al., 2003; Robin et al., 2003), even in mitochondrial membranes (Martin et al., 2013). Regardless of the diet, the membrane FA composition can also be specific to each individual in order to maintain cellular homeostasis in response to environmental conditions. Seasonal influence on FA composition was observed in total lipids of temperate tunas (Selmi and Sadok, 2010) which can be related to homeoviscous adaptation of cell membrane in response to temperature-shifts (Hazel, 1997). The sea surface temperature is relatively constant in the tropical Indian Ocean (around $27.7 \pm 1.1^\circ\text{C}$ in 2013 according to data provided by purse seiner logbooks), limiting seasonal influences that could be experienced by tunas in the studied areas. Nevertheless, tropical tunas encounter large temperature changes due to their vertical behavior implying that such deep-dives might require specific FA compositions in cell membranes. Using internal tags in YFT, Schaefer et al. (2011) recorded dives in 5°C waters, during which the internal temperature of fish fall to 15°C , whereas body and water temperature were equivalent in surface. As different individual diving behaviors have already been observed in some tunas

CHAPITRE 8. INFLUENCE DES FACTEURS BIOLOGIQUES ET ENVIRONNEMENTAUX SUR LA COMPOSITION EN ACIDE GRAS

species (Howell et al., 2010; Fuller et al., 2015), the inter-individual variability in FA composition of PL could possibly reflect different kinds of vertical behaviors between individuals that were analyzed. Such vertical behaviors could be linked to inter-individual differences in distribution of 20:4n-6 between PL and NL in YFT white muscle for larger individuals (> 90 cm FL; Figure 8.5), since the diving capacity of YFT and BET increases with size (Graham and Dickson, 2004).

The vertical habitat of YFT is predicted to be reduced into a shallower depth range due to climate changes (Del Raye and Weng, 2015). These authors suggested that tolerance of YFT to inhospitable environments is highly developed but that YFT would be forced to rely on these adaptations in the future. Thus, the physiological tolerance of tropical tunas in response to environmental changes must be assessed, and studies of the FA composition in tissues and diets could contribute to this evaluation in fish.

8.5.4 Conclusion

Comparison of storage and structural lipids in tissues of tropical tunas from the Western Indian Ocean revealed a low lipid storage except in liver of YFT and BET, related to their reproductive strategy, and that 20:5n-3 is less associated to biological membranes than 20:4n-6 and 22:6n-3. The 20:4n-6 seemed particularly important in muscles and for ovary development. The 22:5n6, 18:0 and 18:1n-9 appeared to be involved in cell homeostasis regulation. The large inter-individual variability in FA composition of structural lipids suggested specific behavioral adaptations and influence of other factors not considered in this study. Finally, intra-specific and size influences on the main FA levels suggested that FA studies could be a gateway for ecophysiological studies even in wild and highly migratory fishes, combining interest for dietary and physiological responses. Nevertheless, experimental studies would help to understand the FA dynamic (i.e., enzyme pathways for FA conversion) and improve interpretation of FA composition in wild fish.

Acknowledgments

The authors thank the MetaToul-AXIOM analytical platform (MetaboHUB, ANR-11-INBS-0010) for providing access to the instrument for FAME profiling. We also wish to thank all SFA lab technicians and IOT Ltd staff for their help throughout the tuna sampling, as well as the IRD/SFA/IEO samplers and the fishermen for their help onboard purse-seiners. This work is a contribution to the projects EMOTION, CANAL, and ALECAP founded by ANR (ANR-11-JSV7-007-01), Thaï Union Europe Group, and France Filière Pêche, respectively.

Partie IV

Discussion générale et perspectives

Les thons tropicaux de l’océan Indien sont aujourd’hui massivement exploités et, bien que l’état de leurs stocks soit régulièrement ré-estimé, le besoin d’évaluer aussi leur état de santé biologique grandit. Cependant, certaines barrières subsistent concernant les connaissances sur la biologie et l’écophysiologie de ces espèces en milieu naturel, et notamment d’un point de vue énergétique. Les objectifs de cette thèse étaient donc d’améliorer nos connaissances et se sont focalisés sur l’allocation d’énergie, principalement sous la forme lipidique, aux grandes fonctions physiologiques. Après une mise au point méthodologique (Manuscrit A : Sardenne et al., 2015b), une étude trophique a été réalisée dans le but de déterminer d’éventuelles différences qualitatives ontogéniques et/ou inter-spécifiques des apports énergétiques (Manuscrit B, soumis). Une évaluation de certains indices de condition en tant qu’indicateur du statut énergétique et du contenu biochimique des tissus, donc d’un point de vue quantitatif, a ensuite été réalisée (Manuscrit C, soumis). Enfin, puisqu’il est apparu que l’aspect quantitatif seul ne suffisait pas pour conclure sur l’état de santé biologique à cause du rôle essentiel de certains nutriments, les compositions en acides gras membranaires ont été étudiées pour préciser les besoins qualitatifs en acides gras des thons tropicaux (Manuscrit D, soumis).

1. Aspects méthodologiques: influence du métabolisme sur les outils utilisés

1.1. Normalisation du taux de lipides dans les études isotopiques

Dans le premier chapitre de ce travail, nous avons évalué la justesse et la précision de trois méthodes arithmétiques de normalisation (i.e. correction) du taux de lipides pour les analyses isotopiques de quatre tissus différents chez les thons tropicaux. Il apparaît que les équations doivent être calibrées pour chaque tissu, et que **les paramètres tirés de la littérature, même sur des espèces proches (e.g. thon rouge) produisent des résultats erronés** sur les thons tropicaux, pouvant altérer ensuite l’interprétation écologique des résultats. Lorsque les paramètres des équations peuvent être calibrés au préalable sur un sous-échantillon du jeu de données, **les corrections linéaires sont les plus simples à mettre en œuvre** car les paramètres sont ajustés empiriquement, alors que les équations non-linéaires et de type "bilan de masse" ont plus de pré-requis (taux de lipides de l’échantillon, ou rapport C/N des protéines pures) et leur qualité de prédiction peut être inférieure. D’autre part, **la méthode de délipidation chimique au dichlorométhane n’affecte pas l’interprétation écologique du $\delta^{15}\text{N}$** , et permet également de connaître le taux de lipides des tissus, comme déjà observé sur des espèces plus grasses (Bodin et al., 2009).

L’ajustement de modèles spécifiques aux tissus pour chaque espèce n’améliore pas la qualité des prédictions par rapport à des modèles uniquement spécifiques aux tissus (i.e. les trois espèces confondues): **les différences entre tissus ont plus d’influence sur la composition isotopique que les différences inter-spécifiques sur des espèces proches** comme les thons tropicaux (Fig.9.1). Ceci met en avant l’influence du métabolisme tissulaire au travers d’un facteur de discrimination spécifique à chaque tissu, comme les différences observées par Schmidt et al. (2004) pour le fractionnement de l’azote chez le krill *Euphausia superba*, entre glande digestive et segment abdominal. Ces auteurs relèvent aussi des différences de composition en acides aminés entre tissus, et suggèrent une influence des taux de synthèse/dégradation des protéines différentes entre tissus. De la même manière, McMahon et al. (2010) observent que la composition isotopique en carbone du muscle de choquemort *Fundulus heteroclitus* correspond à celle des acides aminés essentiels contenus dans son alimentation, alors que le taux de fractionnement est beaucoup plus fort pour les acides aminés non-essentiels. Une tendance similaire est observée sur les acides gras, puisque Koussoroplis

et al. (2010) observent sur le mullet *Liza saliens* que le $\delta^{13}\text{C}$ des AG membranaires, et particulièrement du DHA, est plus faible que celui des AG constituant les lipides de stockage. Ainsi, les nutriments essentiels étant par définition mieux conservés entre les niveaux trophiques, leur fractionnement isotopique semble plus faible que celui des autres composés qui seront alors enrichis en isotopes lourds suite à de plus nombreuses métabolisations.

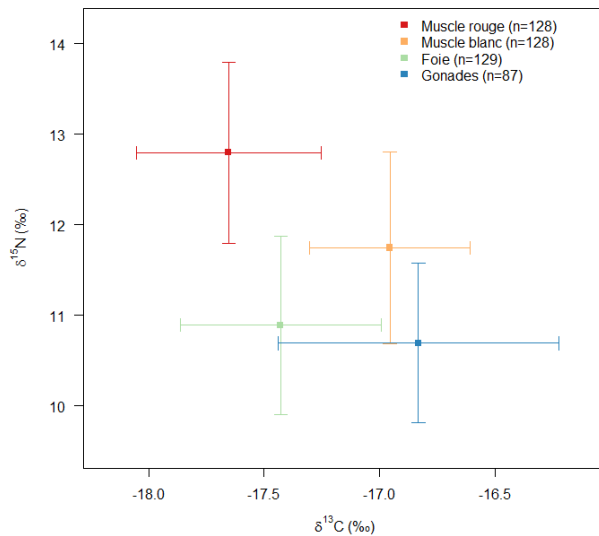


Fig. 9.1: Compositions isotopiques moyennes en azote et carbone, après délipidation chimique au dichlorométhane, de quatre tissus provenant de trois thons tropicaux (*T. obesus*, *K. pelamis* et *T. albacares*) de l'Ouest de l'océan Indien.

Une influence tissu-spécifique a des implications notamment en écologie trophique lors de la comparaison des compositions isotopiques de différentes espèces : les différences isotopiques pourraient être imputées à des caractéristiques différentes entre tissus et non à des différences trophiques. Chez les poissons suffisamment gros le muscle blanc est généralement le tissu de référence (Pinnegar and Polunin, 1999), mais les individus de petite taille sont souvent analysés entiers, risquant d'altérer le signal et justifiant les précautions sémantiques souhaitées par Martinez del Rio et al. (2009) (e.g. facteur de discrimination pour un tissu *vs.* fractionnement trophique pour un organisme entier). Chez des espèces phylogéniquement éloignées, la comparaison entre tissus aux métabolismes "équivalents" n'est pas toujours évidente, e.g. à la manière des muscles blanc et rouge chez les poissons, le manteau des céphalopodes présente localement des caractéristiques différentes (Mommensen et al., 1981), qu'il conviendrait probablement de distinguer dans les analyses trophiques (e.g. Cherel et al., 2009). **Les différences de métabolismes isotopiques entre tissus doivent donc être considérées et limitées dans la mesure du possible, de manière à réduire les erreurs d'interprétation écologique,** d'autant plus qu'elles sont susceptibles d'évoluer selon le statut physiologique des individus (croissance, formation de réserves... e.g. Pecquerie et al., 2010). Globalement, en période de croissance intense, la synthèse des nouveaux tissus prend le pas sur leur renouvellement, ce qui peut impacter les compositions isotopiques (Lee Cruz et al., 2012; Trueman et al., 2005), d'autant plus que les besoins en nutriments essentiels (donc moins métabolisés) sont particulièrement importants à cette période (Cowey, 1994; Izquierdo, 1996). En ce sens, l'apport des analyses isotopiques des nutriments (CSIA-AA et CSIA-FA) chez les thons tropicaux permettrait aussi de mieux comprendre et intégrer l'influence de leur métabolisme sur leurs compositions isotopiques.

1.2. Indices de condition morphométrique

Chez les thons tropicaux **les indices de condition basés sur des mesures morphométriques reflètent mal le contenu biochimique des tissus**, y compris des muscles, comme observé pour certains poissons tempérés (Goñi and Arrizabalaga, 2010; McPherson et al., 2010; Brosset et al., 2015). L'utilisation de ces indices (Indice de Le Cren, ratio entre circonférence et taille, indice hépato-somatique) ne doit donc pas être interprété comme un reflet de la densité en énergie des tissus chez thons tropicaux. En revanche, **l'indice gonado-somatique apparaît comme un indice relativement fiable de la composition proximale (protéines et lipides) des gonades chez les trois thons tropicaux, notamment chez les femelles** (Manuscrit C).

Chez les thons tropicaux, les indices basés sur la morphométrie ne rendent pas compte de la concentration en composés énergétiques (i.e. lipides et protéines). Cette faible corrélation est probablement en lien avec le métabolisme énergétique des thons tropicaux (qui ne stockent pas d'énergie, notamment dans le muscle blanc qui représente la majorité de la masse des thons) et avec les différences de temps d'intégration entre mesures morphométriques et biochimiques (pluriannuel *vs.* saisonnier). Ces espèces étant relativement maigres naturellement, le suivi des teneurs en lipides et/ou protéines n'est probablement pas le plus adapté pour évaluer l'état de santé de ces espèces, comme sur les espèces tempérées (e.g. Lambert and Dutil, 1997; McPherson et al., 2010). **Il semble donc qu'un suivi de la croissance des tissus pourrait être plus pertinent chez les thons tropicaux, et il serait donc intéressant de prendre en compte l'âge réel des individus** (non pas l'âge obtenu après conversion de la taille) pour interpréter les mesures morphométriques. En effet, deux individus de même âge peuvent avoir une morphométrie (taille, circonférence...) différente, qui reflète des compromis d'allocation d'énergie passés (e.g. entre croissance et reproduction; Heino and Kaitala, 1999). Sans connaître l'âge des individus, il apparaît difficile d'interpréter des différences de morphométrie, d'autant plus qu'elles ne reflètent pas un contenu biochimique. Cependant, l'estimation de l'âge des thons tropicaux à partir des otolithes étant peu fiable pour le moment (Sardenne et al., 2015a), de nouvelles techniques devraient être développées.

Les études qui ont observé de bonnes corrélations entre le contenu énergétique du muscle et des indices morphométriques portaient essentiellement sur des espèces tempérées, qui rencontrent de fortes variations saisonnières (e.g. Couture et al., 1998; Lambert and Dutil, 1997; Alonso-Fernández and Saborido-Rey, 2012), mais aussi dont la gamme de variation des indices de condition était plus forte que celle observée ici (e.g. indice de Le Cren compris entre 0.45 et 1.1 chez la morue *Gadus morhua*; Lambert and Dutil, 1997) (Fig. 9.2). Il semble donc que les espèces issues de milieux tropicaux présentent des caractéristiques biologiques particulières et que les méthodes couramment employées sur des espèces tempérées ne soit pas forcément transposables. Ceci implique donc que de nouvelles études soient menées afin de mieux comprendre le fonctionnement et les adaptations spécifiques des espèces tropicales.

D'autre part, les termes "santé", "bien-être", "embonpoint" sont des concepts imprécis. Une définition claire des indices de condition est nécessaire car elle reste floue et limite la validation des indices puis l'interprétation écologique (Hayes and Shonkwiler, 2001). **Lorsque les indices de condition existant dans la littérature ne peuvent pas être validés (e.g. indices de Fulton, de Le Cren...), la détermination empirique des relations entre contenu biochimique et mesures morphométriques devrait être préférée**, car elle permet de clarifier ce qui est réellement mesuré (e.g. le contenu en lipides ou en protéines). Cependant, dans notre étude (Manuscrit C), nous n'avons pas pu ajuster de tels modèles uniquement sur la base de la taille et du poids somatique, appuyant l'idée que ces mesures morphométriques ne peuvent pas être interprétés comme un reflet du contenu biochimique. Il semble donc difficile d'attribuer un état de

santé uniquement sur la base de la morphométrie ou de la biochimie chez les thons tropicaux. Cependant, en plus de l'âge, la considération d'autres paramètres biologiques (e.g. sexe, maturité) pourrait s'avérer utile pour interpréter des différences de croissance des tissus.

Enfin, les indices de condition prennent en considération uniquement un aspect quantitatif, sans tenir compte de l'aspect qualitatif des nutriments, pourtant essentiel pour la santé des organismes (Kainz et al., 2004) : la notion d'état de santé inclut de multiples composantes, qu'il serait également intéressant d'intégrer.

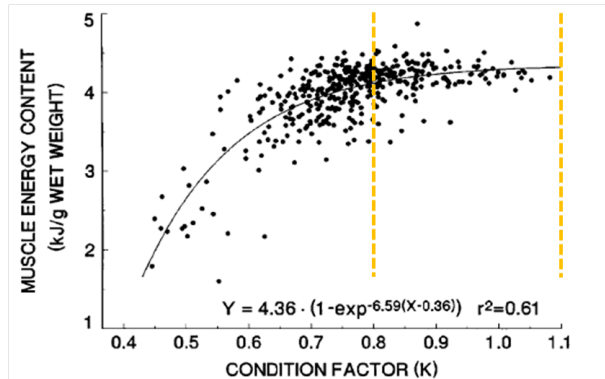


Fig. 9.2: Relation entre le contenu énergétique du muscle et l'indice de condition de Le Cren (K_n) chez la morue *Gadus morhua* observée par Lambert et Dutil (1997). Les pointillés orange figurent la gamme de variation de ce même indice observée chez les thons tropicaux dans notre étude.

2. Comparaisons de la répartition de l'énergie

2.1. Utilisation des différentes formes d'énergie

La composition proximale de chaque tissu était relativement similaire entre thons tropicaux (Tableau 7.3, Manuscrit C). Les taux de protéines sont élevés en comparaison aux lipides et relativement constants dans chaque tissu, hormis dans les gonades dont le contenu augmente avec la maturité. Les protéines allouées à la reproduction semblent donc issues d'une synthèse spécifiquement dédiée, comme le cas connu de la vitellogénine, synthétisée dans le foie puis envoyée aux ovaires (Silversand and Haux, 1995). La faible variabilité des taux de protéines dans les muscles suggère que les protéines issues de l'alimentation sont peu accumulées mais directement consommées pour produire de l'énergie, mais aussi que les protéines constituant les tissus ont un rôle structural et sont donc rarement dégradées pour produire de l'énergie (sauf en situation de jeûne extrême ; McCue, 2010). En revanche, les protéines issues de alimentation sont une source d'énergie importante chez des espèces carnivores telles que les thons. D'autre part, leur synthèse constitue une grosse partie des dépenses énergétiques chez les poissons en phase de croissance (20-50 % ; Carter and Houlihan, 2001), notamment pour la synthèse de myofibrille dans les muscles (Mommsen, 2001), et l'étude des acides aminés essentiels pourrait à ce titre fournir des informations nutritionnelles complémentaires fort utiles. On notera cependant que deux situations sont regroupées sous le terme de croissance : une croissance en nombre de cellules ou une croissance en taille des cellules. Ainsi, Weatherley et al. (1979) notent que chez des jeunes truites *Salmo gairdneri* nourries *ad libitum*, la croissance du muscle correspond à une augmentation du nombre de fibres musculaires tandis que chez celles subissant une restriction calorique la croissance correspond à une augmentation du diamètre des fibres, et le même résultat est obtenu sur les muscles rouge et blanc (Valente et al., 1999).

Chez les trois espèces de thons tropicaux, peu de lipides sont stockés dans les muscles (Manuscrit C). Bien que le taux de lipides du muscle blanc soit faible, la grande proportion de ce tissu (plus de 50% de la masse totale du corps ; Graham et al., 1983) lui permet de contenir une grande partie des lipides corporels, mais

ces lipides sont principalement structuraux. A l'inverse, le taux de lipides du muscle rouge est plus élevé, notamment en lipides de stockage (sous forme de triacylglycérol). Cependant, le métabolisme lipidique du muscle rouge ne permet pas de déterminer si les lipides stockés peuvent être ré-alloués vers d'autres tissus, ou s'ils sont uniquement consommés "sur-place" via la β -oxydation. Cette observation suggère néanmoins qu'une grande partie de l'énergie est consacrée à la nage de routine et la thermorégulation (principales fonctions du muscle rouge).

Avec une grande variabilité du taux de lipides, qui n'est observée dans aucun autre tissu, **le foie semble pouvoir stocker des lipides, possiblement en vue d'une redistribution à d'autres tissus** chez *T. albacares* voire chez *T. obesus*, mais dans une moindre mesure chez *K. pelamis*, tel que montré par Zudaire et al. (2014) et Grande et al. (2012) sur les femelles en période de reproduction de ces deux espèces respectivement. C'est ainsi que *T. albacares* est considéré comme une espèce *income-capital breeder* tandis que *K. pelamis* est une espèce *income-breeder* stricte. Le manque de connaissance concernant la stratégie de reproduction de *T. obesus* et le nombre restreint d'individus d'un stade de maturité suffisamment avancé limitent nos conclusions concernant cette espèce. Cependant, les niveaux élevés de lipides dans le foie de certains individus suggèrent que cette espèce puisse, comme *T. albacares*, utiliser le foie comme organe de stockage de lipides. Bien que l'investissement d'énergie à la reproduction semble partiellement soutenu par l'énergie stockée dans le foie chez *T. albacares* et *T. obesus*, aucune période claire d'augmentation du stockage de lipides n'a cependant été observée, et suggère donc plutôt une accumulation des lipides progressive et continue avant la ponte. Cependant, Zudaire et al. (2015) font état d'une alimentation des femelles de *T. albacares* plus riche en petits poissons gras durant la mousson de nord-est, c'est-à-dire en période de reproduction. Une raréfaction des proies, quelque soit la période de l'année pourrait donc avoir des conséquences sur le niveau d'investissement reproductif des thons tropicaux. Malgré un stockage partiel d'énergie en vue de la reproduction chez *T. albacares* et *T. obesus*, **les trois thons tropicaux ont peu de réserves énergétiques et une raréfaction des proies, si elle devenait drastique, n'aurait pas seulement un impact sur la reproduction mais aussi sur la survie des individus**, qui dépendent en permanence de la disponibilité en proies leurs besoins métaboliques élevés (i.e. nage rapide, thermorégulation...). Il apparaît donc nécessaire de connaître le type de proies des thons et leur qualité énergétique pour bien comprendre comment se maintiennent les thons tropicaux.

Pour une même espèce, l'augmentation avec la taille des taux de lipides et protéines des gonades (Manuscrit C), va dans le sens d'un investissement énergétique plus fort aux cellules germinales avec la taille, et suggère une plus forte viabilité des embryons issus de la reproduction de gros individus. Cette observation a été faite chez de nombreuses espèces (e.g. Berkeley et al., 2004b,a) et renforce l'idée d'effet maternel chez *T. albacares* avancé par Costalago et al., (soumis) et l'importance des gros individus pour assurer le recrutement et le maintien des stocks de thons tropicaux. D'autre part, l'investissement énergétique pour la reproduction (sous la forme de lipides et protéines) apparaissait plus faible chez les mâles que chez les femelles, suggérant deux situations non exclusives : soit (i) une dépense d'énergie des mâles au travers du comportement ou d'autres composés non mesurés ici ; soit (ii) une croissance supérieure chez les mâles grâce à un investissement effectivement moindre pour la production de cellules germinales. Dans l'ouest de l'océan Indien, les plus gros thons tropicaux capturés sont généralement des mâles (communications de l'observatoire thonier) et la croissance estimée de ces derniers apparaît plus rapide que celle des femelles chez *T. albacares*, et *T. obesus* au delà de 3-4 ans (Eveson et al., 2015), appuyant plutôt la seconde hypothèse pour ces deux espèces. En revanche, de telles différences de croissance n'ont pas été relevées chez *K. pelamis*, alors que des différences sexuelles ont été observées dans les compositions proximales des gonades et en AG du foie (Manuscrit B). A

l'avenir, le développement de modèles bioénergétiques de type DEB permettrait une approche intégrée de ces différents flux d'énergie, mais aussi de leur évolution au cours de l'ontogénie. Une partie de ce travail est en cours sur *T. albacares* (Dortel et al., en préparation), notamment pour essayer de comprendre les mécanismes associés à une croissance en deux stances chez cette espèce.

2.2. Acides gras essentiels chez les thons

Dans les quatre tissus étudiés, les ω 6-AGPI et notamment **l'ARA et son dérivé le 22:5 ω 6, et le DHA semblent particulièrement nécessaires au maintien de l'homéostasie chez les thons tropicaux** et sont relativement peu stockés mais introduits dans les membranes, alors que l'EPA semble *a priori* suffisamment présent dans les proies des thons pour être en bonne partie stocké. Plus spécifiquement, dans le muscle blanc, la proportion d'ARA retenue dans les lipides membranaires augmente avec la taille jusqu'à environ 90 cm chez *T. albacares* et *T. obesus* puis se stabilise, suggérant que les besoins membranaires en ARA de ce muscle augmentent en période de forte croissance chez ces deux espèces. Mais des études expérimentales devraient être réalisées pour conclure. Pour le moment, l'implication de l'ARA dans la croissance est surtout établie pour de nombreuses larves (e.g. Estévez et al., 1999; Bessonart et al., 1999; Copeman et al., 2002). Bien qu'en proportion largement majoritaire dans les tissus de thons, le DHA est largement incorporé dans les membranes des cellules hépatiques et toujours au même niveau (aucune influence des facteurs testés ; Manuscrit D), alors même que les proportions de DHA arrivant de l'alimentation et stockées dans les lipides neutres varient entre espèces et diminuent avec la taille (Manuscrit D) en lien avec le changement alimentaire ontogénique observé (Fig. ??b ; Manuscrit B). Ces résultats suggèrent l'importance du maintien d'un certain niveau de DHA membranaire (autour de 20–30 %) pour les fonctions hépatiques et que ces besoins changent relativement peu au cours du développement (i.e. avec la taille, le sexe ou la maturité).

D'autre part, **les compositions des membranes des différents tissus présentent une variabilité inter-individuelle relativement forte** (i.e. de larges écart-types, équivalents à ceux retrouvés dans les lipides de stockage). Deux hypothèses principales semblent pouvoir expliquer une telle variation : (i) une diversité alimentaire forte et distincte entre individus d'une même espèce, c'est-à-dire des "spécialisations" individuelles fortes, qui impacteraient la composition des PLs (en plus des NLs); et/ou (ii) une grande tolérance à la variabilité en AG des membranes. Les comportements alimentaires opportunistes des thons tropicaux (Ménard et al., 2006; Potier et al., 2004) rendent la première hypothèse *a priori* peu probable. Cependant, les contenus stomacaux des thons révèlent parfois la présence d'un seul type de proies (e.g. Ménard and Marchal, 2003; Potier et al., 2008). Ce comportement alimentaire semble correspondre à des *blooms* saisonniers ou ponctuels de proies mais qui ne sont probablement pas exclusifs sur plusieurs semaines (ordre de grandeur du *turnover* des acides gras). En revanche, des différences ontogéniques plus durables sont observées chez *T. albacares*, et *T. obesus* (inférieur/supérieur à 100 cm) dans les lipides de stockage, qui sont impactés prioritairement par le régime alimentaire, et une influence de la taille a effectivement été détectée sur les niveaux de certains AG membranaires (notamment l'ARA des cellules musculaires). Les différences alimentaires des thons, notamment d'un point de vue ontogénique, peuvent donc contribuer aux variabilités inter-individuelles observées. D'autre part, l'impact d'une relative tolérance face aux variations des compositions membranaires en AG mérite d'être considérée. En effet, deux types d'incorporation d'ARA dans les membranes des cellules musculaires sont observées après 90 cm chez *T. albacares* (Fig. ??, Manuscrit D). Ces différences pourraient correspondre à des réponses physiologiques différentes selon les environnements rencontrés (oxygène, température, pression...) et/ou refléter des comportements verticaux différents, comme enregistrés dans le Pacifique (Fuller et al., 2015; Howell et al., 2010). En effet, il semble probable que les

différences environnementales rencontrées lors de plongées profondes soient à l'origine de certaines adaptations physiologiques différentes entre individus restant en surface et individus effectuant de nombreuses plongées profondes.

Dans de prochaines études, il faudrait tester dans quelle mesure les compositions membranaires reflètent un comportement, de manière à évaluer la tolérance de ces espèces dans l'océan Indien, qui risque d'être mise à l'épreuve dans les prochaines décennies avec les changements globaux. Jusqu'à présent, peu d'études se sont intéressées à l'apport des compositions membranaires en AG pour la compréhension de l'écophysiologie des thons tropicaux. En effet, chez ces espèces, les compositions en AG sont le plus souvent étudiées d'un point de vue trophique et dans leur totalité (i.e. sans séparer les fractions neutres et polaires). **Or, les différences de compositions entre ces deux fractions indiquent pourtant clairement une influence du métabolisme, et leur analyse séparée peut donc offrir une voie d'accès à l'écophysiologie de ces espèces en milieu naturel.** D'autre part, des modèles décrivant la composition en AG essentiels selon le niveau d'ingestion et les capacités de transformation (élongation, désaturation...) pourraient être développés afin de prédire les capacités d'adaptation physiologique des organismes selon différents scénarios environnementaux, comme le modèle mécaniste de type "bilan de masse" développé pour la perche *Perca flavescens* en eau douce (Sawyer et al., 2016).

2.3. Changements alimentaires ontogéniques

Sur la base des compositions en AG du foie, un changement alimentaire a été détecté chez *T. obesus* et *T. albacares* autour de 90 et 100 cm respectivement, avec une augmentation de l'assimilation d'AGMI, servant majoritairement de combustible énergétique (Dalsgaard et al., 2003) : la qualité des lipides assimilés change donc avec le développement de *T. obesus* et *T. albacares*. Le rôle énergétique de ces AGMI, notamment utilisés pour la production d'ATP par les mitochondries, peut être associé aux besoins énergétiques liés au développement de la thermorégulation dans le muscle rouge, notamment pour les plongées profondes. Cette alimentation plus riche en AGMI se fait donc au détriment des AGPI, qui sont plus présents chez les petits individus qui restent en surface (juvéniles de *T. obesus* et *T. albacares* et *K. pelamis*). Concernant les résultats isotopiques, nous avons observé un ralentissement de l'augmentation des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ dans le muscle autour de 55 cm chez *T. obesus* et *T. albacares* (pas de ralentissement chez *K. pelamis*). Ce ralentissement pourrait correspondre au changement alimentaire détecté par Graham et al. (2006), autour de 45-50 cm, sur *T. albacares* associés à des DCP ancrés à Hawaï sur la base des compositions isotopiques et des contenus stomacaux. Cependant, dans notre étude, ce changement n'a pas été observé ni avec les compositions en AG et les valeurs isotopiques du foie, ni dans le comportement (les thons de taille inférieure à 55 cm provenaient des mêmes bancs que ceux de taille inférieure à 100 cm, comme cela est souvent le cas dans ce type de pêcherie à la senne, Chassot et al., 2015). Ce ralentissement n'a donc pas été attribué à un changement alimentaire mais plutôt à un changement physiologique, dont la nature n'est cependant pas claire puisque les tailles à première maturité se situent autour de 75 et 100 cm FL chez ces espèces (Zudaire et al., 2013a; Farley et al., 2006). En revanche, il est intéressant de constater qu'un tel changement autour de 55 cm a été observé dans différents environnements (Océan Indien *vs.* Pacifique; DCP dérivant hauturier *vs.* DCP ancré côtier), et il serait intéressant d'éclaircir son origine en élargissant les comparaisons à d'autres environnements par exemple.

3. Relations trophiques inter-spécifiques dans l'océan Indien

Les thons tropicaux sont reconnus comme des espèces opportunistes : cette stratégie alimentaire est certainement plus adaptée en milieu oligotrophe. En dépit du fait qu'ils partagent une même stratégie alimentaire et des proies similaires, il apparaît que **la compétition inter-spécifique diminue avec l'augmentation de la taille, et ce notamment grâce à des changements alimentaires ontogéniques chez *T. obesus* et *T. albacares*** autour de 100 cm, probablement en lien avec le développement des capacités de plongée de ces espèces leur permettant d'atteindre des proies riches en AGMI, telles que les myctophidés. A l'inverse, les proportions d'AGPI semblent supérieures dans l'alimentation de *K. pelamis*. Cependant, il serait nécessaire de connaître les compositions en AG des proies pour conclure plus clairement sur ces aspects compétitifs. L'utilisation de techniques permettant d'obtenir les compositions isotopiques spécifiques des acides gras (i.e. CSIA-FA) permettrait certainement de clarifier les dépendances trophiques des thons en précisant l'origine des AG essentiels aux thons.

Parallèlement, les compositions isotopiques des tissus des thons de grande taille (*T. obesus* et *T. albacares* > 100 cm) sont différentes, bien que leurs métabolismes isotopiques soient probablement similaires à taille équivalente. Ainsi, des différences alimentaires entre ces espèces semblent plausibles : bien que leurs proies soient riches en AGMI, elles peuvent être de différentes tailles ou espèces (e.g. espèces différentes de myctophidés). Cependant, lorsqu'ils sont regroupés en bancs et chassent ensemble, il semble peu probable que ces thons aient une alimentation différente qui soit à l'origine des différences isotopiques observées. Il apparaît plus probable que **les thons de grande taille se regroupent en bancs multi-spécifiques pendant une durée inférieure au temps de renouvellement tissulaire** (quelques mois selon les *turnovers* isotopiques estimés par Madigan et al., 2012). Les deux espèces se regrouperaient alors temporairement pour chasser, mais les bancs formés n'auraient pas de caractère permanent.

L'influence des DCP sur la santé des thons tropicaux est une question récurrente (e.g. Marsac et al., 2000; Hallier and Gaertner, 2008; Jaquemet et al., 2011; Dagorn et al., 2013; Fonteneau et al., 2013; Robert et al., 2014). Plusieurs études mettent en effet en garde contre un possible piège écologique (*ecological trap*, Schlaepfer et al., 2002) qui pourrait emmener les poissons dans des zones peu favorables d'un point de vue alimentaire (Jaquemet et al., 2011). L'étude réalisée dans le cadre de cette thèse (Manuscrit B) n'aborde pas cette question car l'échantillonnage ne comportait (i) pas suffisamment de gros thons capturés sous DCP pour réaliser une comparaison représentative (seulement 8 gros *T. albacares* étaient associés à des DCP et provenaient tous du canal du Mozambique); (ii) aucun petit thon, et notamment de *K. pelamis*, capturé en banc libre. Cependant, on observe que la composition en AG des 8 gros individus *T. albacares* est proche de celle des juvéniles (associés aux DCP) et non de celle des *T. albacares* de taille similaire provenant de bancs libres. **Il semble donc que ces gros individus associés aux DCP se sont nourris plutôt comme des juvéniles, i.e. en surface**, pendant un temps suffisamment long pour être visible dans leur compositions en AG (plusieurs semaines voire mois). Ces individus n'ont donc soit jamais quitté les eaux de surface depuis leur stade juvénile pour s'alimenter, soit ont été attirés par un DCP pendant plusieurs semaines voir mois (*turnover* des AG selon Budge et al., 2011). Étant donné le faible nombre d'échantillons, conclure à un effet négatif de l'association aux DCP n'est pas possible ici mais il ne peut pas être exclu. Des études portant sur les AG, avec un échantillonnage plus adapté, pourraient fournir une contribution intéressante à cette question, qui jusqu'à présent n'a été abordée d'un point de vue trophique que sur la base des contenus stomacaux et des compositions isotopiques.

Les variations alimentaires saisonnières et entre zones de pêche sont apparues relativement limitées, notamment car les traceurs utilisés ne sont pas sensibles à des événements ponctuels dans le temps

et l'espace (e.g. *blooms* de certaines proies, Romanov et al., 2015). D'autre part, le $\delta^{15}\text{N}$ des thons tropicaux est plus bas dans le canal du Mozambique que dans le reste de l'Ouest de l'océan Indien, comme observé dans plusieurs études (e.g. Ménard et al., 2007a; Zudaire et al., 2015). Une partie de cette différence peut être attribuable à: (i) des différences de longueur des réseaux trophiques entre les deux régions, comme suggéré par l'étude des métaux lourds bio-accumulés dans les thons de ces deux régions (Kojadinovic et al., 2006, 2007). Sur la base des compositions isotopiques des thons, ces réseaux trophiques seraient alors plus courts dans le canal du Mozambique. Puisque les espèces de proies des thons sont globalement les mêmes dans ces deux régions (e.g. Ménard et al., 2013; Zudaire et al., 2015), ce "raccourcissement" aurait lieu à des niveaux trophiques inférieurs; ou (ii) aux différences de ligne de base, pouvant provenir de l'azote fixé à la base des réseaux trophiques: azote atmosphérique dans le canal du Mozambique et azote issu de la dénitrification dans les zones à faible taux d'oxygène, comme la mer d'Arabie au nord du bassin (Ménard et al., 2007a). Glud et al. (2015) observent aussi que les carcasses de copépodes constituent de micro-environnements anoxiques qui sont le siège de processus de dénitrification microbiens particuliers, notamment dans les zones de minimum d'oxygène en milieu pélagique. On peut envisager que ces processus viennent s'ajouter à l'influence des communautés de phytoplancton sur les signatures isotopiques de la matière organique particulière (Soares et al., 2015), affectant la signature de la ligne de base. En effet, Dupuy et al. (2016) observent une composition isotopique en azote plus faible de la POM dans le canal du Mozambique, qui est attribuée à la présence de phytoplancton diazotrophe (*Trichodesmium spp.*) dans cette région.

Le changement alimentaire lié à la taille permet de rendre compte des potentielles différences en termes de qualité nutritionnelle des proies, et probablement d'une "stratification" des principaux groupes d'AG, avec les AGPI plutôt retrouvés dans les proies de surface (e.g. crustacés) et des AGMI plutôt dans des proies vivant en profondeur (e.g. myctophidés). Cependant, des analyses spécifiques sur ces proies devraient être réalisées pour décrire au mieux les sources d'AG, et d'énergie en règle générale, disponibles pour les thons. Les analyses d'AG des espèces pélagiques de l'ouest de l'océan Indien sont à ce jour trop peu nombreuses et ne permettent donc pas de visualiser correctement les relations trophiques existant dans cette zone. **Pourtant, le rôle essentiel de certains AG dans les réseaux trophiques devrait alerter quant aux possibles effets en cascade dus aux changements globaux (*Essential fatty acids limitation hypothesis*, Litzow et al., 2006; Werbrouck et al., 2016), notamment aux stades larvaire et juvénile chez les prédateurs**, qui ont particulièrement besoin d'AG essentiels pour leur développement mais sont incapables de les synthétiser (Tocher, 2003). Ainsi, sans une adaptation thermique, Thomas et al. (2012) prédisent une perte de diversité des communautés phytoplanctoniques d'environ 10 à 20% d'ici 30 ans en zone tropicale. Or une faible diversité des communautés de phytoplancton semble à l'origine d'un dérèglement des rapports $\omega 3/\omega 6$ et DHA/ARA chez les copépodes, et en conséquence de mortalités massives d'alevins de saumon *Salmo salar* en mer Baltique (Ahlgren et al., 2005). Une augmentation de CO_2 est aussi à l'origine de la diminution d'AGPI au profit d'AG saturés chez une diatomée, réduisant la croissance et la reproduction du copépode *Acartia tonsa* (Rossoll et al., 2012). Des études concernant le transfert des AG à travers les réseaux trophiques, et notamment des AG essentiels, semblent donc nécessaires aussi bien pour évaluer la santé des écosystèmes que pour des questions de santé humaine.

4. Conclusion

L'énergie assimilée par les thons tropicaux est différente selon leur taille: les petits thons se nourrissent plus en surface sur des proies riches en AGPI, alors que les plus grands dépendent plus de petits poissons

riches en AGMI (Fig. 9.3). Une fois assimilée, l'énergie se répartie différemment entre les différentes fonction physiologiques : la nage implique un grand nombre de protéines pour la construction des fibres musculaires, mais consomme aussi des lipides pour la nage de routine. Les thons tropicaux stockent relativement peu d'énergie, excepté dans le foie de *T. albacares* et *T. obesus* principalement en vue d'une ré-allocation à la reproduction, notamment chez les femelles. Le DHA, l'ARA, le 22:5 ω 6 et le 18:0 sont particulièrement nécessaires au maintien de l'homéostasie membranaire dans l'ensemble des tissus. Ces principaux résultats se trouvent synthétisés dans la Fig. 9.3.

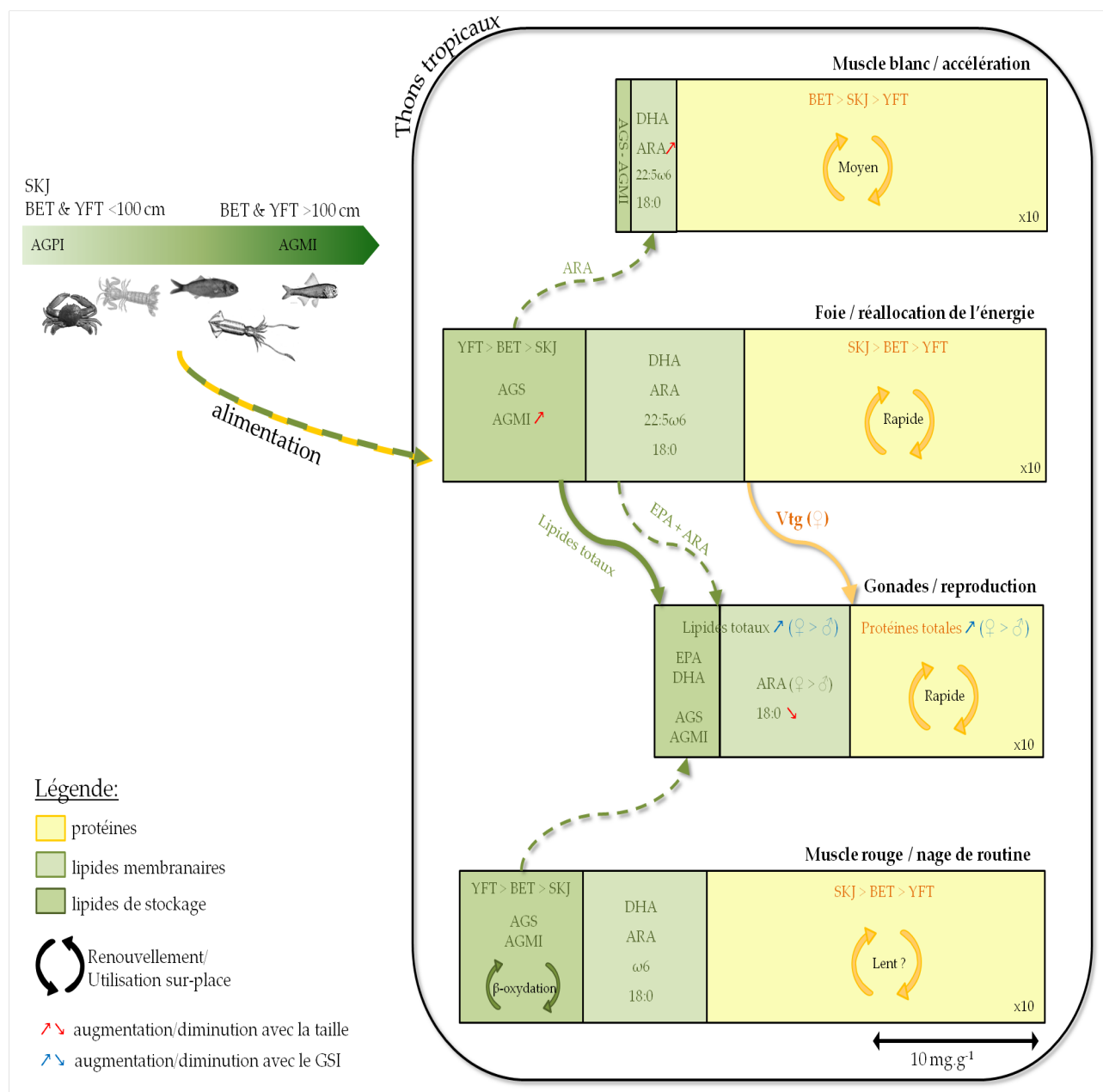


Fig. 9.3: Proportions relatives en lipides et protéines (mg.g⁻¹) dans les quatre tissus étudiés chez les thon tropicaux. **Les flèches en pointillées indiquent des hypothèses** concernant les échanges de lipides et acides gras entre tissus. Notez que la proportion de protéines a été divisée par 10 pour améliorer la lisibilité de la figure. BET=*T. obesus*; SKJ=*K. pelamis*; YFT=*T. albacares*; ARA=Acide arachidonique; DHA=Acide docosahexaénoïque; EPA=Acide eicosapentaénoïque; AGMI=Acides gras mono-insaturés; AGS=Acides gras saturés; AGPI=Acides gras poly-insaturés; Vtg=Vitellogénine; GSI=Indice gonado-somatique.

Bibliographie

- Adams, S. M., 1999. Ecological role of lipids in the health and success of fish populations. In: Arts, M. T., Wainman, B. C. (Eds.), *Lipids in freshwater ecosystems*. Springer, pp. 132–160.
- Ahlgren, G., Nieuwerburgh, L. V., Wänstrand, I., Pedersén, M., Boberg, M., Snoeijs, P., 2005. Imbalance of fatty acids in the base of the Baltic Sea food web: a mesocosm study. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62 (10), 2240–2253.
- Alonso-Fernández, A., Saborido-Rey, F., 2012. Relationship between energy allocation and reproductive strategy in *Trisopterus luscus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 416–417, 8–16.
- Alvarado Bremer, J. R., Naseri, I., Ely, B., 1997. Orthodox and unorthodox phylogenetic relationships among tunas revealed by the nucleotide sequence analysis of the mitochondrial DNA control region. *Journal of Fish Biology* 50 (3), 540–554.
- Alves, A., de Barros, P., Pinho, M. R., 2002. Age and growth studies of bigeye tuna *Thunnus obesus* from Madeira using vertebrae. *Fisheries Research* 54 (3), 389–393.
- Anholt, R. D. V., Spanings, F. a. T., Koven, W. M., Nixon, O., Bonga, S. E. W., 2004. Arachidonic acid reduces the stress response of gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Journal of Experimental Biology* 207 (19), 3419–3430.
- Arnold, W., Giroud, S., Valencak, T. G., Ruf, T., 2015. Ecophysiology of Omega Fatty Acids: A Lid for Every Jar. *Physiology* 30 (3), 232–240.
- Arthur, P. G., West, T. G., Brill, R. W., Schulte, P. M., Hochachka, P. W., 1992. Recovery metabolism of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) white muscle: rapid and parallel changes in lactate and phosphocreatine after exercise. *Canadian Journal of Zoology* 70 (6), 1230–1239.
- Arts, M. T., Ackman, R. G., Holub, B. J., 2001. "Essential fatty acids" in aquatic ecosystems: a crucial link between diet and human health and evolution. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58 (1), 122–137.
- Arts, M. T., Kohler, C. C., 2009. Health and condition in fish: the influence of lipids on membrane competency and immune response. In: Kainz, M., Brett, M. T., Arts, M. T. (Eds.), *Lipids in Aquatic Ecosystems*. Springer New York, pp. 237–256.
- Athenstaedt, K., Daum, G., 2006. The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63 (12), 1355–1369.

- Baby, L., Sankar, T. V., Anandan, R., 2014. Comparison of lipid profile in three species of myctophids from the South West coast of Kerala, India. *National Academy Science Letters* 37 (1), 33–37.
- Bachan, M. M., Fleming, I. A., Trippel, E. A., 2012. Maternal allocation of lipid classes and fatty acids with seasonal egg production in Atlantic cod (*Gadus morhua*) of wild origin. *Marine biology* 159 (10), 2281–2297.
- Ballantyne, J. S., 2004. Mitochondria: aerobic and anaerobic design—lessons from molluscs and fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 139 (3), 461–467.
- Ballantyne, J. S., Mercure, F., Gerrits, M. F., Van Der Kraak, G., McKinley, S., Martens, D. W., Hinch, S. G., Diewert, R. E., 1996. Plasma nonesterified fatty acid profiles in male and female sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) during the spawning migration. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53 (6), 1418–1426.
- Balogun, A. M., Talabi, S. O., 1985. Proximate analysis of the flesh and anatomical weight composition of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Food chemistry* 17 (2), 117–123.
- Barkley, R. A., Neill, W. H., Gooding, R. M., 1978. Skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*, habitat based on temperature and oxygen requirements. *Fisheries Bulletin* 76 (3), 653–662.
- Batts, B. S., 1972. Age and growth of the skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis* (Linnaeus), in North Carolina waters. *Chesapeake Science* 13 (4), 237–244.
- Bec, A., Perga, M.-E., Koussoroplis, A., Bardoux, G., Desvillettes, C., Bourdier, G., Mariotti, A., 2011. Assessing the reliability of fatty acid-specific stable isotope analysis for trophic studies: FA-SIA in *Daphnia*. *Methods in Ecology and Evolution* 2 (6), 651–659.
- Béhagle, N., du Buisson, L., Josse, E., Lebourges-Dhaussy, A., Roudaut, G., Ménard, F., 2014. Mesoscale features and micronekton in the Mozambique Channel: An acoustic approach. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 100, 164–173.
- Bell, J. G., Ashton, I., Secombes, C. J., Weitzel, B. R., Dick, J. R., Sargent, J. R., 1996. Dietary lipid affects phospholipid fatty acid compositions, eicosanoid production and immune function in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 54 (3), 173–182.
- Bell, J. G., Sargent, J. R., 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture* 218 (1–4), 491–499.
- Bell, J. G., Tocher, D. R., Farndale, B. M., Sargent, J. R., 1998. Growth, mortality, tissue histopathology and fatty acid compositions, eicosanoid production and response to stress, in juvenile turbot fed diets rich in γ -linolenic acid in combination with eicosapentaenoic acid or docosahexaenoic acid. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 58 (5), 353–364.
- Benedito-Palos, L., Navarro, J. C., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2010. Tissue-specific robustness of fatty acid signatures in cultured gilthead sea bream (L.) fed practical diets with a combined high replacement of fish meal and fish oil. *Journal of Animal Science* 88 (5), 1759–1770.
- Benoit-Bird, K. J., Au, W. W. L., Wisdom, D. W., Sep. 2009. Nocturnal light and lunar cycle effects on diel migration of micronekton. *Limnology and Oceanography* 54 (5), 1789–1800.

- Berkeley, S. A., Chapman, C., Sogard, S. M., 2004a. Maternal age as a determinant of larval growth and survival in a marine fish, *Sebastes melanops*. *Ecology* 85 (5), 1258–1264.
- Berkeley, S. A., Hixon, M. A., Larson, R. J., Love, M. S., 2004b. Fisheries sustainability via protection of age structure and spatial distribution of fish populations. *Fisheries* 29 (8), 23–32.
- Bernal, D., Dickson, K. A., Shadwick, R. E., Graham, J. B., 2001. Review: analysis of the evolutionary convergence for high performance swimming in lamnid sharks and tunas. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 129 (2), 695–726.
- Bertrand, A., Josse, E., 2000. Tuna target-strength related to fish length and swimbladder volume. *ICES Journal of Marine Science* 57 (4), 1143–1146.
- Bessey, C., Vanderklift, M. A., 2014. Drying method has no substantial effect on $\delta^{15}\text{N}$ or $\delta^{13}\text{C}$ values of muscle tissue from teleost fishes: Effect of drying method on $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values of fish muscle tissue. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 28 (3), 265–273.
- Bessonart, M., Izquierdo, M. S., Salhi, M., Hernández-Cruz, C. M., González, M. M., Fernández-Palacios, H., 1999. Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Aquaculture* 179 (1–4), 265–275.
- Biro, P. A., Post, J. R., Abrahams, M. V., 2005. Ontogeny of energy allocation reveals selective pressure promoting risk-taking behaviour in young fish cohorts. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 272 (1571), 1443–1448.
- Black, D., Love, R. M., 1988. Estimating the carbohydrate reserves in fish. *Journal of Fish Biology* 32 (3), 335–340.
- Bodin, N., Budzinski, H., Le Ménach, K., Tapie, N., 2009. ASE extraction method for simultaneous carbon and nitrogen stable isotope analysis in soft tissues of aquatic organisms. *Analytica Chimica Acta* 643 (1–2), 54–60.
- Bodin, N., Le Loc'h, F., Hily, C., 2007. Effect of lipid removal on carbon and nitrogen stable isotope ratios in crustacean tissues. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 341 (2), 168–175.
- Bodin, N., Lucas, V., Dewals, P., Adeline, M., Esparon, J., Chassot, E., 2014. Effect of brine immersion freezing on the determination of ecological tracers in fish. *European Food Research and Technology* 238 (6), 1057–1062.
- Boggs, C. H., Kitchell, J. F., 1991. Tuna metabolic rates estimated from energy losses during starvation. *Physiological Zoology*, 502–524.
- Bolger, T., Connolly, P. L., 1989. The selection of suitable indices for the measurement and analysis of fish condition. *Journal of Fish Biology* 34 (2), 171–182.
- Bolnick, D. I., Amarasekare, P., Araújo, M. S., Bürger, R., Levine, J. M., Novak, M., Rudolf, V. H. W., Schreiber, S. J., Urban, M. C., Vasseur, D. A., 2011. Why intraspecific trait variation matters in community ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 26 (4), 183–192.
- Boye, J., Musyl, M., Brill, R., Malte, H., 2009. Transectional heat transfer in thermoregulating bigeye tuna (*Thunnus obesus*) - a 2d heat flux model. *Journal of Experimental Biology* 212 (22), 3708–3718.

- Braun, M. H., Brill, R. W., Gosline, J. M., Jones, D. R., 2003. Form and function of the bulbus arteriosus in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*), bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and blue marlin (*Makaira nigricans*): static properties. *Journal of Experimental Biology* 206 (19), 3311–3326.
- Brill, R. W., 1994. A review of temperature and oxygen tolerance studies of tunas pertinent to fisheries oceanography, movement models and stock assessments. *Fisheries Oceanography* 3 (3), 204–216.
- Brill, R. W., Bigelow, K. A., Musyl, M. K., Fritsches, K. A., Warrant, E. J., 2005. Bigeye tuna (*Thunnus obesus*) behavior and physiology and their relevance to stock assessments and fishery biology. Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT 57 (2), 142–161.
- Brill, R. W., Bushnell, P. G., 2001. The cardiovascular system of tunas. *Fish physiology* 19, 79–120.
- Brosset, P., Fromentin, J.-M., Ménard, F., Pernet, F., Bourdeix, J.-H., Bigot, J.-L., Van Beveren, E., Pérez Roda, M. A., Choy, S., Saraux, C., 2015. Measurement and analysis of small pelagic fish condition: A suitable method for rapid evaluation in the field. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 462, 90–97.
- Brown, S. L., Landry, M. R., Selph, K. E., Jin Yang, E., Rii, Y. M., Bidigare, R. R., May 2008. Diatoms in the desert: Plankton community response to a mesoscale eddy in the subtropical North Pacific. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 55 (10–13), 1321–1333.
- Brown-Peterson, N. J., Wyanski, D. M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B. J., Lowerre-Barbieri, S. K., 2011. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Marine and Coastal Fisheries* 3 (1), 52–70.
- Brusle, J., Anadon, G. G., 1996. The structure and function of fish liver. *Fish morphology*, 77–93.
- Buchheister, A., Latour, R. J., 2010. Turnover and fractionation of carbon and nitrogen stable isotopes in tissues of a migratory coastal predator, summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 67 (3), 445–461.
- Budge, S. M., Iverson, S. J., Koopman, H. N., 2006. Studying trophic ecology in marine ecosystems using fatty acids: a primer on analysis and interpretation. *Marine Mammal Science* 22 (4), 759–801.
- Budge, S. M., Penney, S. N., Lall, S. P., 2011. Response of tissue lipids to diet variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Implications for estimating diets with fatty acid analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 409 (1–2), 267–274.
- Budge, S. M., Wooller, M. J., Springer, A. M., Iverson, S. J., McRoy, C. P., Divoky, G. J., 2008. Tracing carbon flow in an arctic marine food web using fatty acid-stable isotope analysis. *Oecologia* 157 (1), 117–129.
- Bushnell, P. G., Jones, D. R., 1994. Cardiovascular and respiratory physiology of tuna: adaptations for support of exceptionally high metabolic rates. *Environmental biology of fishes* 40 (3), 303–318.
- Cada, G. F., Loar, J. M., Sale, M. J., 1987. Evidence of Food Limitation of Rainbow and Brown Trout in Southern Appalachian Soft-Water Streams. *Transactions of the American Fisheries Society* 116 (5), 692–702.

- Cardinale, M., Casini, M., Arrhenius, F., 2002. The influence of biotic and abiotic factors on the growth of sprat (*Sprattus sprattus*) in the Baltic Sea. *Aquatic Living Resources* 15 (05), 273–281.
- Carey, F. G., Teal, J. M., 1966. Heat conservation in tuna fish muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 56 (5), 1464–1469.
- Carter, C. G., Houlihan, D. F., 2001. Protein synthesis. Vol. 20 of Nitrogen Excretion. Academic Press, pp. 31–75.
- Cayre, P., Diouf, T., Stretta, J. M., 1988. Biologie des thons. FAO Fisheries Technical Paper (292).
- Cayré, P., Laloé, F., 1986. Review of the gonad index (GI) and an introduction to the concept of its “critical value”: application to the skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* in the Atlantic Ocean. *Marine biology* 90 (3), 345–351.
- Cejas, J. R., Almansa, E., Jérez, S., Bolaños, A., Samper, M., Lorenzo, A., 2004. Lipid and fatty acid composition of muscle and liver from wild and captive mature female broodstocks of white seabream, *Diplodus sargus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 138 (1), 91–102.
- Cequier-Sánchez, E., Rodríguez, C., Ravelo, Á. G., Zárate, R., 2008. Dichloromethane as a Solvent for Lipid Extraction and Assessment of Lipid Classes and Fatty Acids from Samples of Different Natures. *J. Agric. Food Chem.* 56 (12), 4297–4303.
- Chamberlin, M. E., Glemet, H. C., Ballantyne, J. S., 1991. Glutamine metabolism in a holostean (*Amia calva*) and teleost fish (*Salvelinus namaycush*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 260 (1), R159–R166.
- Chambers, R. C., Leggett, W. C., 1996. Maternal influences on variation in egg sizes in temperate marine fishes. *American Zoologist* 36 (2), 180–196.
- Chapman, E. W., Jørgensen, C., Lutcavage, M. E., Hilborn, R., 2011. Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*): a state-dependent energy allocation model for growth, maturation, and reproductive investment. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 68 (11), 1934–1951.
- Chassot, E., Assan, C., Soto, M., Damiano, A., de Molina, A. D., Joachim, L., Cauquil, P., Cauquil, P., Lesperance, F., Curpen, M., Lucas, J., Floch, L., 2015. Statistics of the European Union and associated flags purse seine fishing fleet targeting tropical tunas in the Indian Ocean 1981–2014. Tech. rep., IOTC-WPTT-17.
- Cherel, Y., Fontaine, C., Jackson, G. D., Jackson, C. H., Richard, P., 2009. Tissue, ontogenic and sex-related differences in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of the oceanic squid *Todarodes filippovae* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Marine Biology* 156 (4), 699–708.
- Chow, S., Kishino, H., 1995. Phylogenetic relationships between tuna species of the genus *Thunnus* (Scombridae: Teleostei): inconsistent implications from morphology, nuclear and mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution* 41 (6), 741–748.
- Claireaux, G., Lagardère, J.-P., Sep. 1999. Influence of temperature, oxygen and salinity on the metabolism of the European sea bass. *Journal of Sea Research* 42 (2), 157–168.

- Clark, T. D., Brandt, W. T., Nogueira, J., Rodriguez, L. E., Price, M., Farwell, C. J., Block, B. A., Jul. 2010. Postprandial metabolism of Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Journal of Experimental Biology* 213 (14), 2379–2385.
- Clementz, M. T., Koch, P. L., Nov. 2001. Differentiating aquatic mammal habitat and foraging ecology with stable isotopes in tooth enamel. *Oecologia* 129 (3), 461–472.
- Collette, B. B., Reeb, C., Block, B. A., 2001. Systematics of the tunas and mackerels (Scombridae). *Fish Physiology* 19.
- Cone, R. S., 1989. The Need to Reconsider the Use of Condition Indices in Fishery Science. *Transactions of the American Fisheries Society* 118 (5), 510–514.
- Copeman, L. A., Parrish, C. C., Brown, J. A., Harel, M., 2002. Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture* 210 (1–4), 285–304.
- Cortés, E., 1997. A critical review of methods of studying fish feeding based on analysis of stomach contents: application to elasmobranch fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54 (3), 726–738.
- Cossa, D., Harmelin-Vivien, M., Mellon-Duval, C., Loizeau, V., Averty, B., Crochet, S., Chou, L., Cadiou, J.-F., 2012. Influences of bioavailability, trophic position, and growth on methylmercury in hakes (*Merluccius merluccius*) from northwestern Mediterranean and northeastern Atlantic. *Environmental science & technology* 46 (9), 4885–4893.
- Costalago, D., Zudaire, I., Murua, H., Grande, M., Potier, M., Chassot, E., Choy, S., Fouché, E., Bertrand-Michel, J., Bodin, N., 2000. Allocation of fatty acids in female yellowfin tuna and effects in the reproductive strategy. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*.
- Couture, P., Dutil, J.-D., Guderley, H., Jul. 1998. Biochemical correlates of growth and condition in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) from Newfoundland. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55 (7), 1591–1598.
- Cowey, C. B., Jul. 1994. Fish nutrition and feeding Amino acid requirements of fish: a critical appraisal of present values. *Aquaculture* 124 (1), 1–11.
- Cucherousset, J., Villéger, S., 2015. Quantifying the multiple facets of isotopic diversity: New metrics for stable isotope ecology. *Ecological Indicators* 56, 152–160.
- Currie, J. C., Lengaigne, M., Vialard, J., Kaplan, D. M., Aumont, O., Naqvi, S. W. A., Maury, O., 2013. Indian Ocean Dipole and El Niño/Southern Oscillation impacts on regional chlorophyll anomalies in the Indian Ocean. *Biogeosciences* 10 (10), 6677–6698.
- Dagorn, L., Holland, K. N., Hallier, J.-P., Taquet, M., Moreno, G., Sancho, G., Itano, D. G., Aumeeruddy, R., Girard, C., Million, J., Fonteneau, A., 2006a. Deep diving behavior observed in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Aquatic Living Resources* 19 (01), 85–88.
- Dagorn, L., Holland, K. N., Itano, D. G., 2006b. Behavior of yellowfin (*Thunnus albacares*) and bigeye (*T. obesus*) tuna in a network of fish aggregating devices (FADs). *Marine Biology* 151 (2), 595–606.

- Dagorn, L., Holland, K. N., Restrepo, V., Moreno, G., 2013. Is it good or bad to fish with FADs? What are the real impacts of the use of drifting FADs on pelagic marine ecosystems? *Fish and Fisheries* 14 (3), 391–415.
- Dalsgaard, J., John, M. S., Kattner, G., Müller-Navarra, D., Hagen, W., 2003. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Advances in marine biology* 46, 225–340.
- De Wever, P., David, B., 2015. La biodiversité de crise en crise. Sciences. Albin Michel.
- Del Raye, G., Weng, K. C., 2015. An aerobic scope-based habitat suitability index for predicting the effects of multi-dimensional climate change stressors on marine teleosts. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 113, 280–290.
- DeNiro, M. J., Epstein, S., 1977. Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science* 197 (4300), 261–263.
- Dethier, M. N., Sosik, E., Galloway, A. W., Duggins, D. O., Simenstad, C. A., 2013. Addressing assumptions: variation in stable isotopes and fatty acids of marine macrophytes can confound conclusions of food web studies. *Marine Ecology Progress Series* 478, 1–14.
- Dewar, H., Brill, R. W., Olson, K. R., Sep. 1994. Secondary circulation of the vascular heat exchangers in skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. *Journal of Experimental Zoology* 269 (6), 566–570.
- Dickson, K. A., 1996. Locomotor muscle of high-performance fishes: what do comparisons of tunas with ectothermic sister taxa reveal? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 113 (1), 39–49.
- Domínguez-Petit, R., Saborido-Rey, F., Medina, I., May 2010. Changes of proximate composition, energy storage and condition of European hake (*Merluccius merluccius*, L. 1758) through the spawning season. *Fisheries Research* 104 (1–3), 73–82.
- Dortel, E., Pecquerie, L., Bousquet, N., Chassot, E., 2015. A Dynamic Energy Budget modelling approach to investigate the eco-physiological factors behind the two-stanza growth of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*).
- Dortel, E., Sardenne, F., Bousquet, N., Rivot, E., Million, J., Le Croizier, G., Chassot, E., 2015. An integrated Bayesian modeling approach for the growth of Indian Ocean yellowfin tuna. *Fisheries Research* 163, 69–84.
- Doucett, R. R., Booth, R. K., Power, G., McKinley, R. S., 1999. Effects of the spawning migration on the nutritional status of anadromous Atlantic salmon (*Salmo salar*): insights from stable-isotope analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56 (11), 2172–2180.
- Dupont-Prinet, A., Chatain, B., Grima, L., Vandeputte, M., Claireaux, G., McKenzie, D. J., Apr. 2010. Physiological mechanisms underlying a trade-off between growth rate and tolerance of feed deprivation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Experimental Biology* 213 (7), 1143–1152.
- Dupuy, C., Pagano, M., Got, P., Domaizon, I., Chappuis, A., Marchessaux, G., Bouvy, M., 2016. Trophic relationships between metazooplankton communities and their plankton food sources in the Iles Eparses (Western Indian Ocean). *Marine Environmental Research*.

- Dutil, J.-D., Lambert, Y., 2000. Natural mortality from poor condition in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 57 (4), 826–836.
- Dutil, J.-D., Lambert, Y., Guderley, H., Blier, P. U., Pelletier, D., Desroches, M., 1998. Nucleic acids and enzymes in Atlantic cod (*Gadus morhua*) differing in condition and growth rate trajectories. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 55 (4), 788–795.
- Ehrich, D., Tarroux, A., Stien, J., Lecomte, N., Killengreen, S., Berteaux, D., Yoccoz, N. G., 2011. Stable isotope analysis: modelling lipid normalization for muscle and eggs from arctic mammals and birds: Lipid normalization for stable isotope analysis. Methods in Ecology and Evolution 2 (1), 66–76.
- El-Sabaawi, R., Dower, J. F., Kainz, M., Mazumder, A., 2008. Characterizing dietary variability and trophic positions of coastal calanoid copepods: insight from stable isotopes and fatty acids. Marine Biology 156 (3), 225–237.
- Elliott, K. H., Davis, M., Elliott, J. E., 2014. Equations for Lipid Normalization of Carbon Stable Isotope Ratios in Aquatic Bird Eggs. PLoS ONE 9 (1), e83597.
- Essington, T. E., 2003. Development and sensitivity analysis of bioenergetics models for skipjack tuna and albacore: a comparison of alternative life histories. Transactions of the American Fisheries Society 132 (4), 759–770.
- Essington, T. E., Kitchell, J. F., Walters, C. J., 2001. The von Bertalanffy growth function, bioenergetics, and the consumption rates of fish. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 58 (11), 2129–2138.
- Estess, E. E., Coffey, D. M., Shimose, T., Seitz, A. C., Rodriguez, L., Norton, A., Block, B., Farwell, C., 2014. Bioenergetics of captive Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). Aquaculture 434, 137–144.
- Estévez, A., McEvoy, L. A., Bell, J. G., Sargent, J. R., 1999. Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed live-prey enriched in Arachidonic and Eicosapentaenoic acids. Aquaculture 180 (3–4), 321–343.
- Eveson, J. P., Million, J., Sardenne, F., Le Croizier, G., 2015. Estimating growth of tropical tunas in the Indian Ocean using tag-recapture data and otolith-based age estimates. Fisheries Research 163, 58–68.
- Farley, J. H., Clear, N. P., Leroy, B., Davis, T. L., McPherson, G., 2006. Age, growth and preliminary estimates of maturity of bigeye tuna, *Thunnus obesus*, in the Australian region. Marine and freshwater Research 57 (7), 713–724.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G. H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. Journal of Biological Chemistry 226 (1), 497–509.
- Fonteneau, A., Ariz, J., Gaertner, D., Nordstrom, V., Pallares, P., 2000. Observed changes in the species composition of tuna schools in the Gulf of Guinea between 1981 and 1999, in relation with the Fish Aggregating Device fishery. Aquatic Living Resources 13 (04), 253–257.
- Fonteneau, A., Chassot, E., Bodin, N., 2013. Global spatio-temporal patterns in tropical tuna purse seine fisheries on drifting fish aggregating devices (DFADs): Taking a historical perspective to inform current challenges. Aquatic Living Resources 26 (01), 37–48.

- Fonteneau, A., Lucas, V., Tewkai, E., Delgado, A., Demarcq, H., 2008. Mesoscale exploitation of a major tuna concentration in the Indian Ocean. *Aquatic Living Resources* 21 (02), 109–121.
- Fraser, A. J., 1989. Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve, and crustacean larvae. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46 (11), 1868–1873.
- Fréon, P., Dagorn, L., 2000. Review of fish associative behaviour: toward a generalisation of the meeting point hypothesis. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10 (2), 183–207.
- Fromentin, J.-M., Fonteneau, A., 2001. Fishing effects and life history traits: a case study comparing tropical versus temperate tunas. *Fisheries Research* 53 (2), 133–150.
- Fry, B., 1988. Food web structure on Georges Bank from stable C, N, and S isotopic compositions. *Limnology and Oceanography* 33 (5), 1182–1190.
- Fry, B., 2002. Stable isotopic indicators of habitat use by Mississippi River fish. *Journal of the North American Benthological Society* 21 (4), 676–685.
- Fry, B., 2007. Stable isotope ecology. Springer Science & Business Media.
- Fry, B., Baltz, D. M., Benfield, M. C., Fleege, J. W., Gace, A., Haas, H. L., Quiñones-Rivera, Z. J., 2003. Stable isotope indicators of movement and residency for brown shrimp (*Farfantepenaeus aztecus*) in coastal Louisiana marshscapes. *Estuaries* 26 (1), 82–97.
- Fuller, D. W., Schaefer, K. M., Hampton, J., Caillot, S., Leroy, B. M., Itano, D. G., 2015. Vertical movements, behavior, and habitat of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in the equatorial central Pacific Ocean. *Fisheries Research* 172, 57–70.
- Gadgil, M., Bossert, W. H., 1970. Life historical consequences of natural selection. *American Naturalist* 104 (935), 1–24.
- Galloway, A. W., Brett, M. T., Holtgrieve, G. W., Ward, E. J., Ballantyne, A. P., Burns, C. W., Kainz, M. J., Müller-Navarra, D. C., Persson, J., Ravet, J. L., 2015. A fatty acid based bayesian approach for inferring diet in aquatic consumers. *PLoS ONE* 10 (6), e0129723.
- Gardner, L. D., Jayasundara, N., Castilho, P. C., Block, B., 2012. Microarray gene expression profiles from mature gonad tissues of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* in the Gulf of Mexico. *BMC Genomics* 13, 530.
- George, J. C., Stevens, E. D., 1978. Fine structure and metabolic adaptation of red and white muscles in tuna. *Environmental Biology of Fishes* 3 (2), 185–191.
- Gilliers, C., Claireaux, G., Galois, R., Loizeau, V., Le Pape, O., 2012. Influence of hydrocarbons exposure on survival, growth and condition of juvenile flatfish: a mesocosm experiment. *Journal of Life Science* 4 (2), 113–122.
- Girard, C., Benhamou, S., Dagorn, L., Feb. 2004. FAD: Fish Aggregating Device or Fish Attracting Device? A new analysis of yellowfin tuna movements around floating objects. *Animal Behaviour* 67 (2), 319–326.
- Glud, R. N., Grossart, H.-P., Larsen, M., Tang, K. W., Arendt, K. E., Rysgaard, S., Thamdrup, B., Gissel Nielsen, T., 2015. Copepod carcasses as microbial hot spots for pelagic denitrification. *Limnology and Oceanography* 60 (6), 2026–2036.

- Goñi, N., Arrizabalaga, H., 2010. Seasonal and interannual variability of fat content of juvenile albacore (*Thunnus alalunga*) and bluefin (*Thunnus thynnus*) tunas during their feeding migration to the Bay of Biscay. *Progress in Oceanography* 86 (1-2), 115–123.
- Gordon, M. S., 1968. Oxygen consumption of red and white muscles from tuna fishes. *Science* 159 (3810), 87–90.
- Graham, B. S., Grubbs, D., Holland, K., Popp, B. N., Dec. 2006. A rapid ontogenetic shift in the diet of juvenile yellowfin tuna from Hawaii. *Marine Biology* 150 (4), 647–658.
- Graham, B. S., Koch, P. L., Newsome, S. D., McMahon, K. W., Aurioles, D., 2010. Using Isoscapes to Trace the Movements and Foraging Behavior of Top Predators in Oceanic Ecosystems. In: West, J. B., Bowen, G. J., Dawson, T. E., Tu, K. P. (Eds.), *Isoscapes*. Springer Netherlands, pp. 299–318.
- Graham, J. B., Dickson, K. A., 2004. Tuna comparative physiology. *Journal of Experimental Biology* 207 (23), 4015–4024.
- Graham, J. B., Koehn, F. J., Dickson, K. A., 1983. Distribution and relative proportions of red muscle in scombrid fishes: consequences of body size and relationships to locomotion and endothermy. *Canadian journal of zoology* 61 (9), 2087–2096.
- Grande, M., 2013. The reproductive biology, condition and feeding ecology of the skipjack, *Katsuwonus pelamis*, in the Western Indian Ocean. Ph.D. thesis, Universidad del Pais Vasco.
- Grande, M., Murua, H., Zudaire, I., Goñi, N., Bodin, N., 2014. Reproductive timing and reproductive capacity of the Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) in the western Indian Ocean. *Fisheries Research* 156, 14–22.
- Grande, M., Murua, H., Zudaire, I., Korta, M., 2010. Spawning activity and batch fecundity of skipjack, *Katsuwonus pelamis*, in the Western Indian Ocean. In: *Proceedings of the 10th Meeting of the Working Party on Tropical Tuna, Indian Ocean Tuna Commission*. Vol. IOTC-WPTT-47.
- Grande, M., Murua, H., Zudaire, I., Korta, M., 2012. Oocyte development and fecundity type of the skipjack, *Katsuwonus pelamis*, in the Western Indian Ocean. *Journal of Sea Research* 73, 117–125.
- Guelinckx, J., Maes, J., Van Den Driessche, P., Geysen, B., Dehairs, F., Ollevier, F., 2007. Changes in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in different tissues of juvenile sand goby *Pomatoschistus minutus*: a laboratory diet-switch experiment. *Marine Ecology Progress Series* 341, 205.
- Guest, M. A., Hirst, A. J., Nichols, P. D., Frusher, S. D., 2010. Multi-scale spatial variation in stable isotope and fatty acid profiles amongst temperate reef species: implications for design and interpretation of trophic studies. *Marine Ecology Progress Series* 410, 25–41.
- Hallier, J.-P., Gaertner, D., 2006. Estimated growth rate of the skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) from tagging surveys conducted in the Senegalese area (1996-1999) within a meta-analysis framework. *Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT* 59 (2), 411–420.
- Hallier, J.-P., Gaertner, D., 2008. Drifting fish aggregation devices could act as an ecological trap for tropical tuna species. *Marine Ecology Progress Series* 353, 255–264.
- Hare, S. R., Harley, S. J., Hampton, W. J., 2015. Verifying FAD-association in purse seine catches on the basis of catch sampling. *Fisheries Research* 172, 361–372.

- Hartman, K. J., Margraf, F. J., Dec. 2008. Common relationships among proximate composition components in fishes. *Journal of Fish Biology* 73 (10), 2352–2360.
- Hastie, T. J., Tibshirani, R. J., 1990. Generalized additive models. Vol. 43. CRC Press.
- Hayes, J. P., Shonkwiler, J. S., 2001. Morphometric indicators of body condition: worthwhile or wishful thinking? In: Speakman, J. R. (Ed.), *Body Composition Analysis of Animals. A Handbook of Non-Destructive Methods*. Cambridge university press, New York, pp. 8–38.
- Hays, G. C., 2003. A review of the adaptive significance and ecosystem consequences of zooplankton diel vertical migrations. In: Jones, M. B., Ingólfsson, A., Ólafsson, E., Helgason, G. V., Gunnarsson, K., Svavarsson, J. (Eds.), *Migrations and Dispersal of Marine Organisms*. No. 174 in *Developments in Hydrobiology*. Springer Netherlands, pp. 163–170.
- Hazel, J. R., 1997. Thermal Aaptation in Biological Membranes: Beyond Homeoviscous Adaptation. *Advances in molecular and cell biology* 19, 57–102.
- Heino, M., Kaitala, V., 1999. Evolution of resource allocation between growth and reproduction in animals with indeterminate growth. *Journal of Evolutionary Biology* 12 (3), 423–429.
- Hiramatsu, N., Todo, T., Sullivan, C. V., Schilling, J., Reading, B. J., Matsubara, T., Ryu, Y.-W., Mizuta, H., Luo, W., Nishimiya, O., Wu, M., Mushirobira, Y., Yilmaz, O., Hara, A., Feb. 2015. Ovarian yolk formation in fishes: Molecular mechanisms underlying formation of lipid droplets and vitellogenin-derived yolk proteins. *General and Comparative Endocrinology*.
- Hoffman, J. C., Sutton, T. T., 2010. Lipid correction for carbon stable isotope analysis of deep-sea fishes. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 57 (8), 956–964.
- Holland, K. N., Brill, R. W., Chang, R. K., Sibert, J. R., Fournier, D. A., 1992. Physiological and behavioural thermoregulation in bigeye tuna (*Thunnus obesus*). *Nature* 358, 410–412.
- Houlihan, D. F., 1991. Protein turnover in ectotherms and its relationships to energetics. In: *Advances in Comparative and Environmental Physiology*. No. 7. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–43.
- Howell, E. A., Hawn, D. R., Polovina, J. J., 2010. Spatiotemporal variability in bigeye tuna (*Thunnus obesus*) dive behavior in the central North Pacific Ocean. *Progress in Oceanography* 56 (1–2), 81–93.
- Huang, X., Yin, Y., Shi, Z., Li, W., Zhou, H., Lv, W., 2010. Lipid content and fatty acid composition in wild-caught silver pomfret (*Pampus argenteus*) broodstocks: Effects on gonad development. *Aquaculture* 310 (1), 192–199.
- Hulbert, A. J., Else, P. L., 1999. Membranes as Possible Pacemakers of Metabolism. *Journal of Theoretical Biology* 199 (3), 257–274.
- Hulbert, W. C., Guppy, M., Murphy, B., Hochachka, P. W., 1979. Metabolic sources of heat and power in tuna muscles: I. muscle fine structure. *The Journal of experimental biology* 82 (1), 289–301.
- Hurst, T. P., Conover, D. O., 2003. Seasonal and interannual variation in the allometry of energy allocation in juvenile striped bass. *Ecology* 84 (12), 3360–3369.

- Hussey, N. E., MacNeil, M. A., McMeans, B. C., Olin, J. A., Dudley, S. F., Cliff, G., Wintner, S. P., Fennessy, S. T., Fisk, A. T., 2014. Rescaling the trophic structure of marine food webs. *Ecology Letters* 17 (2), 239–250.
- Ingram, T., Matthews, B., Harrod, C., Stephens, T., Grey, J., Markel, R., Mazumder, A., 2007. Lipid extraction has little effect on the $\delta^{15}\text{N}$ of aquatic consumers. *Limnology and Oceanography* 5, 338–343.
- Intarasirisawat, R., Benjakul, S., Visessanguan, W., 2011. Chemical compositions of the roes from skipjack, tongol and bonito. *Food Chemistry* 124 (4), 1328–1334.
- IOTC, 2015a. Female tuna reproductive cycle - Protocol for histology analysis. Tech. Rep. IOTC-2015-WPTT17-INF03.
- IOTC, 2015b. Nominal catch by species and gear, by vessel flag reporting country. Tech. Rep. Datasets.
- IOTC, 2015c. Resolution sur la gestion des Dispositifs de Concentration de poissons (DCP). Tech. Rep. IOTC-2015-S19-PropJ.
- IOTC, 2015d. Status summary for species of tuna and tuna-like species under the IOTC mandate, as well as other species impacted by IOTC fisheries. Tech. Rep. IOTC-2015-SC18-R[E].
- Ishihara, K., Saito, H., 1996. The docosahexaenoic acid content of the lipid of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* caught in the sea off Japanese coast. *Fisheries science* 62 (5), 840–841.
- Iverson, S. J., 2009. Tracing aquatic food webs using fatty acids: from qualitative indicators to quantitative determination. In: Kainz, M. J., Brett, M. T., Arts, M. T. (Eds.), *Lipids in Aquatic Ecosystems*. Springer, pp. 281–308.
- Iverson, S. J., Field, C., Don Bowen, W., Blanchard, W., 2004. Quantitative fatty acid signature: a new method of estimating predator diets. *Ecological Monographs* 74 (2), 211–235.
- Izquierdo, M. S., 1996. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition* 2 (4), 183–191.
- Jakob, E. M., Marshall, S. D., Uetz, G. W., 1996. Estimating fitness: a comparison of body condition indices. *Oikos*, 61–67.
- Jaquemet, S., Potier, M., Cherel, Y., Kojadinovic, J., Bustamante, P., Richard, P., Catry, T., Ramos, J. A., Corre, M. L., 2008. Comparative foraging ecology and ecological niche of a superabundant tropical seabird: the sooty tern *Sterna fuscata* in the southwest Indian Ocean. *Marine Biology* 155 (5), 505–520.
- Jaquemet, S., Potier, M., Ménard, F., 2011. Do drifting and anchored Fish Aggregating Devices (FADs) similarly influence tuna feeding habits? A case study from the western Indian Ocean. *Fisheries Research* 107 (1-3), 283–290.
- Jardine, T. D., Gray, M. A., McWilliam, S. M., Cunjak, R. A., 2005. Stable Isotope Variability in Tissues of Temperate Stream Fishes. *Transactions of the American Fisheries Society* 134 (5), 1103–1110.
- Jardine, T. D., MacLatchy, D. L., Fairchild, W. L., Cunjak, R. A., Brown, S. B., 2004. Rapid carbon turnover during growth of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) smolts in sea water, and evidence for reduced food consumption by growth-stunts. *Hydrobiologia* 527 (1), 63–75.

- Johnson, R. B., 2009. Lipid Deposition in Oocytes of Teleost Fish During Secondary Oocyte Growth. *Reviews in Fisheries Science* 17 (1), 78–89.
- Johnston, I. A., Bower, N. I., Macqueen, D. J., May 2011. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *The Journal of Experimental Biology* 214 (10), 1617–1628.
- Jones, G. P., Oct. 1987. Competitive Interactions Among Adults and Juveniles in a Coral Reef Fish. *Ecology* 68 (5), 1534–1547.
- Juan-Jordá, M. J., Mosqueira, I., Cooper, A. B., Freire, J., Dulvy, N. K., 2011. Global population trajectories of tunas and their relatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (51), 20650–20655.
- Juan-Jordá, M. J., Mosqueira, I., Ferrer-Jordá, E., Dulvy, N. K., ????. Global scombrid life history dataset. *Ecology*.
- Jusup, M., Klanjscek, T., Matsuda, H., Kooijman, S. A. L. M., 2011. A full lifecycle bioenergetic model for bluefin tuna. *PLoS ONE* 6 (7), e21903.
- Kainz, M., Arts, M. T., Mazumder, A., 2004. Essential fatty acids in the planktonic food web and their ecological role for higher trophic levels. *Limnology and Oceanography* 49 (5), 1784–1793.
- Kamler, E., Nov. 2005. Parent–egg–progeny Relationships in Teleost Fishes: An Energetics Perspective. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15 (4), 399–421.
- Kannupandi, T., Ravi, A. V., Soundarapandian, P., 2006. Biochemical changes in relation to larval development of the portunid crab *Charybdis lucifera* (Fabricius). *Indian Journal of Fisheries* 53 (2), 225–230.
- Kaplan, D. M., Chassot, E., Amandé, J. M., Dueri, S., Demarcq, H., Dagorn, L., Fonteneau, A., 2014. Spatial management of Indian Ocean tropical tuna fisheries: Potential and perspectives. *ICES Journal of Marine Science* 71 (7), 1728–1749.
- Kaufman, S. D., Johnston, T. A., Leggett, W. C., Moles, M. D., Casselman, J. M., Schulte-Hostedde, A. I., 2007. Relationships between body condition indices and proximate composition in adult walleyes. *Transactions of the American Fisheries Society* 136 (6), 1566–1576.
- Kelly, L. J., Del Rio, C. M., 2010. The fate of carbon in growing fish: an experimental study of isotopic routing. *Physiological and Biochemical Zoology* 83 (3), 473–480.
- Kerambrun, E., Henry, F., Perrichon, P., Courcot, L., Meziane, T., Spilmont, N., Amara, R., 2012. Growth and condition indices of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments: Effects of metallic and organic compounds. *Aquatic Toxicology* 108, 130–140.
- Kessler, R. J., Fanestil, D. D., 1986. Interference by lipids in the determination of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 159 (1), 138–142.
- Kiljunen, M., Grey, J., Sinisalo, T., Harrod, C., Immonen, H., Jones, R. I., 2006. A revised model for lipid-normalizing $\delta^{13}\text{C}$ values from aquatic organisms, with implications for isotope mixing models: Revised lipid-normalization model for C isotope analysis. *Journal of Applied Ecology* 43 (6), 1213–1222.
- Killen, S. S., Marras, S., McKenzie, D. J., 2011. Fuel, fasting, fear: routine metabolic rate and food deprivation exert synergistic effects on risk-taking in individual juvenile European sea bass. *Journal of animal ecology* 80 (5), 1024–1033.

- Kleiber, M., 1961. The fire of life. An introduction to animal energetics. John Wiley & Sons, New York.
- Klinger, D. H., Dale, J. J., Gleiss, A. C., Brandt, T., Estess, E. E., Gardner, L., Machado, B., Norton, A., Rodriguez, L., Stiltner, J., Farwell, C., Block, B. A., 2016. The effect of temperature on postprandial metabolism of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology.
- Kojadinovic, J., Potier, M., Le Corre, M., Cosson, R. P., Bustamante, P., Aug. 2006. Mercury content in commercial pelagic fish and its risk assessment in the Western Indian Ocean. Science of The Total Environment 366 (2–3), 688–700.
- Kojadinovic, J., Potier, M., Le Corre, M., Cosson, R. P., Bustamante, P., Mar. 2007. Bioaccumulation of trace elements in pelagic fish from the Western Indian Ocean. Environmental Pollution 146 (2), 548–566.
- Kojadinovic, J., Richard, P., Le Corre, M., Cosson, R. P., Bustamante, P., 2008. Effects of Lipid Extraction on $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ Values in Seabird Muscle, Liver and Feathers. Waterbirds 31 (2), 169–178.
- Kooijman, S. A. L. M., 2010. Dynamic energy budget theory for metabolic organisation. Cambridge university press.
- Korsmeyer, K. E., Dewar, H., 2001. Tuna metabolism and energetics. Fish Physiology 19, 35–78.
- Koussoroplis, A., Bec, A., Perga, M., Koutrakis, E., Desvillettes, C., Bourdier, G., 2010. Nutritional importance of minor dietary sources for leaping grey mullet *Liza saliens* (Mugilidae) during settlement: insights from fatty acid $\delta^{13}\text{C}$ analysis. Marine Ecology Progress Series 404, 207–217.
- Koussoroplis, A.-M., Bec, A., Perga, M.-E., Koutrakis, E., Bourdier, G., Desvillettes, C., 2011. Fatty acid transfer in the food web of a coastal Mediterranean lagoon: Evidence for high arachidonic acid retention in fish. Estuarine, Coastal and Shelf Science 91 (3), 450–461.
- Koven, W. M., Tandler, A., Kissil, G. W., Sklan, D., Friezlander, O., Harel, M., 1990. The effect of dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids on growth, survival and swim bladder development in *Sparus aurata* larvae. Aquaculture 91 (1–2), 131–141.
- Kurle, C. M., Koch, P. L., Tershy, B. R., Croll, D. A., Jul. 2014. The effects of sex, tissue type, and dietary components on stable isotope discrimination factors ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) in mammalian omnivores. Isotopes in Environmental and Health Studies 50 (3), 307–321.
- Lambert, Y., Dutil, J.-D., 1997. Can simple condition indices be used to monitor and quantify seasonal changes in the energy reserves of cod (*Gadus morhua*)? Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 54 (S1), 104–112.
- Lands, W. E., 2009. Human life: caught in the food web. In: Kainz, M. J., Brett, M. T., Arts, M. T. (Eds.), Lipids in Aquatic Ecosystems. Springer New York, pp. 327–354.
- Lang, K. L., Grimes, C. B., Shaw, R. F., 1994. Variations in the age and growth of yellowfin tuna larvae, *Thunnus albacares*, collected about the Mississippi River plume. Environ Biol Fish 39 (3), 259–270.
- Layman, C. A., Quattrochi, J. P., Peyer, C. M., Allgeier, J. E., 2007. Niche width collapse in a resilient top predator following ecosystem fragmentation. Ecology Letters 10 (10), 937–944.

- Le Cren, E. D., 1951. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). The Journal of Animal Ecology, 201–219.
- Le Pape, O., Bonhommeau, S., 2015. The food limitation hypothesis for juvenile marine fish. Fish and Fisheries 16 (3), 373–398.
- Lee, A. G., 2003. Lipid–protein interactions in biological membranes: a structural perspective. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1612 (1), 1–40.
- Lee, R. F., Hagen, W., Kattner, G., 2006. Lipid storage in marine zooplankton. Marine Ecology Progress Series 307 (1), 273–306.
- Lee Cruz, L., McGill, R. A. R., Goodman, S. J., Hamer, K. C., Apr. 2012. Stable isotope ratios of a tropical marine predator: confounding effects of nutritional status during growth. Marine Biology 159 (4), 873–880.
- Leggett, M. F., 1998. Food-web dynamics of Lake Ontario as determined by carbon and nitrogen stable isotope analysis. Ph.D. thesis, University of Waterloo.
- Lehodey, P., Leroy, B., 1999. Age and growth of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) from the western and central Pacific Ocean as indicated by daily growth increments and tagging data. WP YFT-2, SCTB 12, 16–23.
- Lessa, R., Duarte-Neto, P., 2004. Age and growth of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) in the western equatorial Atlantic, using dorsal fin spines. Fisheries Research 69 (2), 157–170.
- Li, Y., Monroig, O., Zhang, L., Wang, S., Zheng, X., Dick, J. R., You, C., Tocher, D. R., 2010. Vertebrate fatty acyl desaturase with $\delta 4$ activity. Proceedings of the National Academy of Sciences 107 (39), 16840–16845.
- Litzow, M. A., Bailey, K. M., Prah, F. G., Heintz, R., 2006. Climate regime shifts and reorganization of fish communities: the essential fatty acid limitation hypothesis. Marine Ecology Progress Series 315, 1–11.
- Lloret, J., Shulman, G., Love, R. M., 2013. Condition and health indicators of exploited marine fishes. John Wiley & Sons.
- Logan, J., Haas, H., Deegan, L., Gaines, E., 2006. Turnover rates of nitrogen stable isotopes in the salt marsh mummichog, *Fundulus heteroclitus*, following a laboratory diet switch. Oecologia 147 (3), 391–395.
- Logan, J. M., Jardine, T. D., Miller, T. J., Bunn, S. E., Cunjak, R. A., Lutcavage, M. E., 2008. Lipid corrections in carbon and nitrogen stable isotope analyses: comparison of chemical extraction and modelling methods. Journal of Animal Ecology 77 (4), 838–846.
- Logan, J. M., Lutcavage, M. E., 2008. A comparison of carbon and nitrogen stable isotope ratios of fish tissues following lipid extractions with non-polar and traditional chloroform/methanol solvent systems. Rapid Communications in Mass Spectrometry 22 (7), 1081–1086.
- Longhurst, A., 1995. Seasonal cycles of pelagic production and consumption. Progress in Oceanography 36 (2), 77–167.
- Longhurst, A. R., 2010. Ecological geography of the sea, 2nd Edition. Academic Press.

- Lorrain, A., Graham, B. S., Popp, B. N., Allain, V., Olson, R. J., Hunt, B. P. V., Potier, M., Fry, B., Galván-Magaña, F., Menkes, C. E. R., Kaehler, S., Ménard, F., 2015. Nitrogen isotopic baselines and implications for estimating foraging habitat and trophic position of yellowfin tuna in the Indian and Pacific Oceans. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 113, 188–198.
- Losse, G. F., Merrett, N. R., 1971. The occurrence of *Oratosquilla investigatoris* (Crustacea: Stomatopoda) in the pelagic zone of the Gulf of Aden and the equatorial western Indian Ocean. *Marine Biology* 10 (3), 244–253.
- Lowe, T. E., Brill, R. W., Cousins, K. L., Jul. 2000. Blood oxygen-binding characteristics of bigeye tuna (*Thunnus obesus*), a high-energy-demand teleost that is tolerant of low ambient oxygen. *Marine Biology* 136 (6), 1087–1098.
- Macko, S. A., Estep, M. L. F., Engel, M. H., Hare, P. E., 1986. Kinetic fractionation of stable nitrogen isotopes during amino acid transamination. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 50 (10), 2143–2146.
- Macnaughton, S. J., Jenkins, T. L., Wimpee, M. H., Cormier, M. R., White, D. C., 1997. Rapid extraction of lipid biomarkers from pure culture and environmental samples using pressurized accelerated hot solvent extraction. *Journal of Microbiological Methods* 31 (1–2), 19–27.
- MacNeil, M., Skomal, G. B., Fisk, A. T., 2005. Stable isotopes from multiple tissues reveal diet switching in sharks. *Marine Ecology Progress Series* 302, 199–206.
- Madigan, D. J., Litvin, S. Y., Popp, B. N., Carlisle, A. B., Farwell, C. J., Block, B. A., 2012. Tissue turnover rates and isotopic trophic discrimination factors in the endothermic teleost, Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *PLoS ONE* 7 (11), e49220.
- Magnuson, J. J., 1973. Comparative study of adaptations for continuous swimming and hydrostatic equilibrium of scombroid and xiphoid fishes. *Fishery Bulletin* 71 (2), 337–356.
- Marchand, F., Boisclair, D., Apr. 1998. Influence of fish density on the energy allocation pattern of juvenile brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55 (4), 796–805.
- Margulies, D., Feb. 1993. Assessment of the nutritional condition of larval and early juvenile tuna and Spanish mackerel (Pisces: Scombridae) in the Panamá Bight. *Marine Biology* 115 (2), 317–330.
- Marsac, F., Fonteneau, A., Ménard, F., 2000. Drifting FADs used in tuna fisheries: an ecological trap? In: Le Gall, J.-Y., Cayré, P., Taquet, M. (Eds.), *Pêche thonière et dispositifs de concentration de poissons*. Vol. 28. Ifremer, Caribbean-Martinique, pp. 537–552.
- Marshall, C. T., Needle, C. L., Thorsen, A., Kjesbu, O. S., Yaragina, N. A., 2006. Systematic bias in estimates of reproductive potential of an Atlantic cod (*Gadus morhua*) stock: implications for stock recruit theory and management. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 63 (5), 980–994.
- Martin, N., Bureau, D. P., Marty, Y., Kraffe, E., Guderley, H., 2013. Dietary lipid quality and mitochondrial membrane composition in trout: responses of membrane enzymes and oxidative capacities. *Journal of Comparative Physiology B* 183 (3), 393–408.
- Martinez del Rio, C., Wolf, N., Carleton, S. A., Gannes, L. Z., Feb. 2009. Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biological Reviews* 84 (1), 91–111.

- McCann, K., Hastings, A., Huxel, G. R., 1998. Weak trophic interactions and the balance of nature. *Nature* 395 (6704), 794–798.
- McClelland, J. W., Montoya, J. P., Aug. 2002. Trophic Relationships and the Nitrogen Isotopic Composition of Amino Acids in Plankton. *Ecology* 83 (8), 2173–2180.
- McConnaughey, T., McRoy, C. P., 1979. Food-web structure and the fractionation of carbon isotopes in the Bering Sea. *Marine Biology* 53 (3), 257–262.
- McCue, M. D., May 2010. Starvation physiology: Reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 156 (1), 1–18.
- McCutchan, J. H., Lewis, W. M., Kendall, C., McGrath, C. C., 2003. Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos* 102 (2), 378–390.
- McMahon, K. W., Fogel, M. L., Elsdon, T. S., Thorrold, S. R., Jul. 2010. Carbon isotope fractionation of amino acids in fish muscle reflects biosynthesis and isotopic routing from dietary protein: Carbon isotope fractionation of fish muscle amino acids. *Journal of Animal Ecology* 79 (5), 1132–1141.
- McMurchie, E. J., 1988. Dietary lipids and the regulation of membrane fluidity and function. *Physiological regulation of membrane fluidity* 3, 189–237.
- McPherson, L. R., Slotte, A., Kvamme, C., Meier, S., Marshall, C. T., 2010. Inconsistencies in measurement of fish condition: a comparison of four indices of fat reserves for Atlantic herring (*Clupea harengus*). *ICES Journal of Marine Science*, fsq148.
- Medina, I., Aubourg, S. P., Martín, R. P., 1997. Species differentiation by multivariate analysis of phospholipids from canned atlantic tuna. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (7), 2495–2499.
- Ménard, F., Benivary, H. D., Bodin, N., Coffineau, N., Le Loc'h, F., Mison, T., Richard, P., Potier, M., 2014. Stable isotope patterns in micronekton from the Mozambique Channel. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 100, 153–163.
- Ménard, F., Labruno, C., Shin, Y.-J., Asine, A.-S., Bard, F.-X., 2006. Opportunistic predation in tuna: a size-based approach. *Marine Ecology Progress Series* 323, 223–231.
- Ménard, F., Lorrain, A., Potier, M., Marsac, F., 2007a. Isotopic evidence of distinct feeding ecologies and movement patterns in two migratory predators (yellowfin tuna and swordfish) of the western Indian Ocean. *Marine Biology* 153 (2), 141–152.
- Ménard, F., Marchal, E., 2003. Foraging behaviour of tuna feeding on small schooling *Vinciguerria nimbaria* in the surface layer of the equatorial Atlantic Ocean. *Aquatic Living Resources* 16 (03), 231–238.
- Ménard, F., Marsac, F., Bellier, E., Cazelles, B., 2007b. Climatic oscillations and tuna catch rates in the Indian Ocean: a wavelet approach to time series analysis. *Fisheries Oceanography* 16 (1), 95–104.
- Ménard, F., Potier, M., Jaquemet, S., Romanov, E., Sabatié, R., Cherel, Y., 2013. Pelagic cephalopods in the western Indian Ocean: New information from diets of top predators. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 95, 83–92.

- Metcalfe, L. D., Schmitz, A. A., 1961. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry* 33 (3), 363–364.
- Michener, R. H., Schell, D. M., 1994. Stable Isotope Ratios as Tracers in Marine Food Webs. In: Michener, R., Lajtha, K. (Eds.), *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp. 138–157.
- Miller, T. W., Jul. 2006. Tissue-specific response of $\delta^{15}\text{N}$ in adult Pacific herring (*Clupea pallasii*) following an isotopic shift in diet. *Environ Biol Fish* 76 (2-4), 177–189.
- Mintenbeck, K., Brey, T., Jacob, U., Knust, R., Struck, U., 2008. How to account for the lipid effect on carbon stable-isotope ratio ($\delta^{13}\text{C}$): sample treatment effects and model bias. *Journal of Fish Biology* 72 (4), 815–830.
- Mommsen, T. P., 2001. Paradigms of growth in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 129 (2–3), 207–219.
- Mommsen, T. P., Ballantyne, J., MacDonald, D., Gosline, J., Hochachka, P. W., 1981. Analogues of red and white muscle in squid mantle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78 (5), 3274–3278.
- Morais, S., Mourente, G., Ortega, A., Tocher, J. A., Tocher, D. R., 2011. Expression of fatty acyl desaturase and elongase genes, and evolution of DHA:EPA ratio during development of unfed larvae of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.). *Aquaculture* 313 (1–4), 129–139.
- Morton, R. E., Evans, T. A., 1992. Modification of the bicinchoninic acid protein assay to eliminate lipid interference in determining lipoprotein protein content. *Analytical Biochemistry* 204 (2), 332–334.
- Mourente, G., Megina, C., Díaz-Salvago, E., 2001. Lipids in female northern bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus* L.) during sexual maturation. *Fish Physiology and Biochemistry* 24 (4), 351–363.
- Mourente, G., Tocher, D. R., 1994. In vivo metabolism of $[1-^{14}\text{C}]$ linolenic acid (18:3(n - 3)) and $[1-^{14}\text{C}]$ eicosapentaenoic acid (20:5(n - 3)) in a marine fish: Time-course of the desaturation/elongation pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1212 (1), 109–118.
- Mourente, G., Tocher, D. R., 2009. Tuna Nutrition and Feeds: Current Status and Future Perspectives. *Reviews in Fisheries Science* 17 (3), 373–390.
- Mousseau, T. A., Fox, C. W., 1998. *Maternal effects as adaptations*. Oxford University Press.
- Murphy, B. R., Brown, M. L., Springer, T. A., Feb. 1990. Evaluation of the Relative Weight (W_r) Index, with New Applications to Walleye. *North American Journal of Fisheries Management* 10 (1), 85–97.
- Murry, B. A., Farrell, J. M., Teece, M. A., Smyntek, P. M., 2006. Effect of lipid extraction on the interpretation of fish community trophic relationships determined by stable carbon and nitrogen isotopes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 63 (10), 2167–2172.
- Murua, H., Eveson, J. P., Marsac, F., Mar. 2015. The Indian Ocean Tuna Tagging Programme: Building better science for more sustainability. *Fisheries Research* 163, 1–6.
- Nakamura, Y.-N., Ando, M., Seoka, M., Kawasaki, K.-i., Tsukamasa, Y., 2007. Changes of proximate and fatty acid compositions of the dorsal and ventral ordinary muscles of the full-cycle cultured Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* with the growth. *Food Chemistry* 103 (1), 234–241.

- Nash, R. D., Valencia, A. H., Geffen, A. J., 2006. The origin of Fulton's condition factor—setting the record straight. *Fisheries* 31 (5), 236–238.
- Neumann, R. M., Guy, C. S., Willis, D. W., 2012. Length, weight, and associated indices. *Fisheries techniques*, 3rd edition. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 637–676.
- Nootmorn, P., 2004. Reproductive biology of bigeye tuna in the eastern Indian Ocean. In: *Proceedings of the 7th Meeting of the Working Party on Tropical Tuna, Indian Ocean Tuna Commission*. Vol. IOTC-WPTT04-05. pp. 1–5.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Wagner, H., 2015. Package 'vegan'.
- Olson, R. J., Boggs, C. H., 1986. Apex Predation by Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*): Independent Estimates from Gastric Evacuation and Stomach Contents, Bioenergetics, and Cesium Concentrations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 43 (9), 1760–1775.
- Olson, R. J., Duffy, L. M., Kuhnert, P. M., Galván-Magaña, F., Bocanegra-Castillo, N., Alatorre-Ramírez, V., 2014. Decadal diet shift in yellowfin tuna *Thunnus albacares* suggests broad-scale food web changes in the eastern tropical Pacific Ocean. *Marine Ecology Progress Series* 497, 157–178.
- Olson, R. J., Popp, B. N., Graham, B. S., López-Ibarra, G. A., Galván-Magaña, F., Lennert-Cody, C. E., Bocanegra-Castillo, N., Wallsgrove, N. J., Gier, E., Alatorre-Ramírez, V., Ballance, L. T., Fry, B., 2010. Food-web inferences of stable isotope spatial patterns in copepods and yellowfin tuna in the pelagic eastern Pacific Ocean. *Progress in Oceanography* 86 (1-2), 124–138.
- Oppel, S., Federer, R. N., O'Brien, D. M., Powell, A. N., Hollmén, T. E., 2010. Effects of Lipid Extraction on Stable Isotope Ratios in Avian Egg Yolk: Is Arithmetic Correction a Reliable Alternative? *The Auk* 127 (1), 72–78.
- Ortega, A., Mourente, G., 2009. Comparison of the lipid profiles from wild caught eggs and unfed larvae of two scombroid fish: northern bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L., 1758) and Atlantic bonito (*Sarda sarda* Bloch, 1793). *Fish Physiol Biochem* 36 (3), 461–471.
- Ovissipour, M., Kenari, A. A., Motamedzadegan, A., Nazari, R. M., May 2010. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*). *Food and Bioprocess Technology* 5 (2), 696–705.
- Pangle, K. L., Sutton, T. M., Apr. 2005. Temporal changes in the relationship between condition indices and proximate composition of juvenile *Coregonus artedii*. *Journal of Fish Biology* 66 (4), 1060–1072.
- Parrish, C. C., 1999. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In: Arts, M. T., Wainmann, B. C. (Eds.), *Lipids in freshwater ecosystems*. Springer, pp. 4–20.
- Parrish, C. C., 2009. Essential fatty acids in aquatic food webs. In: Kainz, M., Brett, M. T., Arts, M. T. (Eds.), *Lipids in Aquatic Ecosystems*. Springer New York, pp. 309–326.
- Parrish, C. C., 2013. Lipids in Marine Ecosystems. *ISRN Oceanography* 2013, 1–16.

- Parrish, C. C., Pethybridge, H., Young, J. W., Nichols, P. D., 2013. Spatial variation in fatty acid trophic markers in albacore tuna from the southwestern Pacific Ocean—A potential ‘tropicalization’ signal. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 113, 199–207.
- Parry, M., 2007. Trophic variation with length in two ommastrephid squids, *Ommastrephes bartramii* and *Sthenoteuthis oualaniensis*. *Marine Biology* 153 (3), 249–256.
- Partridge, G. J., Benetti, D. D., Stieglitz, J. D., Hutapea, J., McIntyre, A., Chen, B., Hutchinson, W., Scholey, V. P., Aug. 2011. The effect of a 24-hour photoperiod on the survival, growth and swim bladder inflation of pre-flexion yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) larvae. *Aquaculture* 318 (3–4), 471–474.
- Pavlov, D. S., Kasumyan, A. O., 2000. Patterns and mechanisms of schooling behavior in fish: a review. *Journal of Ichthyology* 40 (2), S163.
- Pecquerie, L., Nisbet, R. M., Fablet, R., Lorrain, A., Kooijman, S. A. L. M., 2010. The impact of metabolism on stable isotope dynamics: a theoretical framework. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 365 (1557), 3455–3468.
- Peng, S., Chen, C., Shi, Z., Wang, L., 2013. Amino acid and fatty acid composition of the muscle tissue of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and bigeye tuna (*Thunnus obesus*). *Journal of Food and Nutrition Research* 1 (4), 42–45.
- Persson, L., 1988. Asymmetries in Competitive and Predatory Interactions in Fish Populations. In: Ebenman, D. B., Persson, D. L. (Eds.), *Size-Structured Populations*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 203–218.
- Pethybridge, H., Bodin, N., Arsenault-Pernet, E. J., Bourdeix, J. H., Brisset, B., Bigot, J. L., Roos, D., Peter, M., 2014. Temporal and inter-specific variations in forage fish feeding conditions in the NW Mediterranean: lipid content and fatty acid compositional changes. *Marine Ecology Progress Series* 512, 39–54.
- Pethybridge, H. R., Nichols, P. D., Virtue, P., Jackson, G. D., 2013. The foraging ecology of an oceanic squid, *Todarodes filippovae*: The use of signature lipid profiling to monitor ecosystem change. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 95, 119–128.
- Pethybridge, H. R., Parrish, C. C., Morrongiello, J., Young, J. W., Farley, J. H., Gunasekera, R. M., Nichols, P. D., 2015a. Spatial patterns and temperature predictions of tuna fatty acids: tracing essential nutrients and changes in primary producers. *PLoS ONE* 10 (7), e0131598.
- Pethybridge, H. R., Young, J. W., Kuhnert, P. M., Farley, J. H., 2015b. Using stable isotopes of albacore tuna and predictive models to characterize bioregions and examine ecological change in the SW Pacific Ocean. *Progress in Oceanography* 134, 293–303.
- Phillips, K. L., Nichols, P. D., Jackson, G. D., 2002. Lipid and fatty acid composition of the mantle and digestive gland of four Southern Ocean squid species: implications for food-web studies. *Antarctic Science* 14 (03).
- Piché, J., Iverson, S., Parrish, F., Dollar, R., 2010. Characterization of forage fish and invertebrates in the Northwestern Hawaiian Islands using fatty acid signatures: species and ecological groups. *Marine Ecology Progress Series* 418, 1–15.

- Pinnegar, J. K., Polunin, N. V. C., 1999. Differential fractionation of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ among fish tissues: implications for the study of trophic interactions. *Functional ecology* 13 (2), 225–231.
- Plourde, S., Grégoire, F., Lehoux, C., Galbraith, P. S., Castonguay, M., Ringuette, M., 2015. Effect of environmental variability on body condition and recruitment success of Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus* L.) in the Gulf of St. Lawrence. *Fisheries Oceanography* 24 (4), 347–363.
- Popp, B. N., Graham, B. S., Olson, R. J., Hannides, C. C., Lott, M. J., López-Ibarra, G. A., Galván-Magaña, F., Fry, B., 2007. Insight into the trophic ecology of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*, from compound-specific nitrogen isotope analysis of proteinaceous amino acids. *Terrestrial Ecology* 1, 173–190.
- Post, D. M., Layman, C. A., Arrington, D. A., Takimoto, G., Quattrochi, J., Montaña, C. G., 2007. Getting to the fat of the matter: models, methods and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses. *Oecologia* 152 (1), 179–189.
- Post, J. R., Parkinson, E. A., 2001. Energy allocation strategy in young fish: allometry and survival. *Ecology* 82 (4), 1040–1051.
- Potier, M., Bach, P., Ménard, F., Marsac, F., 2014. Influence of mesoscale features on micronekton and large pelagic fish communities in the Mozambique Channel. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 100, 184–199.
- Potier, M., Marsac, F., Cherel, Y., Lucas, V., Sabatié, R., Maury, O., Ménard, F., 2007. Forage fauna in the diet of three large pelagic fishes (lancetfish, swordfish and yellowfin tuna) in the western equatorial Indian Ocean. *Fisheries Research* 83 (1), 60–72.
- Potier, M., Marsac, F., Lucas, V., Sabatié, R., Hallier, J. P., Ménard, F., 2004. Feeding partitioning among tuna taken in surface and mid-water layers: the case of yellowfin (*Thunnus albacares*) and bigeye (*T. obesus*) in the western tropical Indian Ocean. *WIOJMS* 3 (1), 51–62.
- Potier, M., Romanov, E., Cherel, Y., Sabatié, R., Zamorov, V., Ménard, F., 2008. Spatial distribution of *Cubiceps pauciradiatus* (Perciformes: Nomeidae) in the tropical Indian Ocean and its importance in the diet of large pelagic fishes. *Aquatic Living Resources* 21 (2), 123–134.
- Potier, M., Sabatié, R., Ménard, F., Marsac, F., 2001. Preliminary results of tuna diet studies in the West Equatorial Indian Ocean. In: *Proceedings of the 4th Meeting of the Working Party on Tropical Tuna, Indian Ocean Tuna Commission*. Vol. IOTC-WPTT01-03. pp. 273–278.
- Pousis, C., De Giorgi, C., Mylonas, C. C., Bridges, C. R., Zupa, R., Vassallo-Agius, R., de la Gándara, F., Dileo, C., De Metrio, G., Corriero, A., 2011. Comparative study of liver vitellogenin gene expression and oocyte yolk accumulation in wild and captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.). *Animal reproduction science* 123 (1), 98–105.
- Pousis, C., Santamaria, N., Zupa, R., De Giorgi, C., Mylonas, C. C., Bridges, C. R., de la Gándara, F., Vassallo-Agius, R., Bello, G., Corriero, A., 2012. Expression of vitellogenin receptor gene in the ovary of wild and captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Animal Reproduction Science* 132 (1–2), 101–110.

- Purchase, C. F., Brown, J. A., Jan. 2001. Stock-specific changes in growth rates, food conversion efficiencies, and energy allocation in response to temperature change in juvenile Atlantic cod. *Journal of Fish Biology* 58 (1), 36–52.
- RDevelopmentCoreTeam, 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Regost, C., Arzel, J., Robin, J., Rosenlund, G., Kaushik, S. J., Mar. 2003. Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*): 1. Growth performance, flesh fatty acid profile, and lipid metabolism. *Aquaculture* 217 (1–4), 465–482.
- Reum, J. C. P., Dec. 2011. Lipid correction model of carbon stable isotopes for a cosmopolitan predator, spiny dogfish *Squalus acanthias*. *Journal of Fish Biology* 79 (7), 2060–2066.
- Revill, A. T., Young, J. W., Lansdell, M., May 2009. Stable isotopic evidence for trophic groupings and bio-regionalization of predators and their prey in oceanic waters off eastern Australia. *Marine Biology* 156 (6), 1241–1253.
- Ricker, W. E., 1975. Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. *Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada* 191, 1–382.
- Robert, M., Dagorn, L., Bodin, N., Pernet, F., Arsenault-Pernet, E.-J., Deneubourg, J. L., Rose, K., 2014. Comparison of condition factors of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) associated or not with floating objects in an area known to be naturally enriched with logs. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences* 71 (3), 472–478.
- Robin, J., Regost, C., Arzel, J., Kaushik, S., 2003. Fatty acid profile of fish following a change in dietary fatty acid source: model of fatty acid composition with a dilution hypothesis. *Aquaculture* 225 (1–4), 283–293.
- Roff, D. A., 1983. An allocation model of growth and reproduction in fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 40 (9), 1395–1404.
- Roger, C., 1994. Relationships among yellowfin and skipjack tuna, their prey-fish and plankton in the tropical western Indian Ocean. *Fisheries Oceanography* 3 (2), 133–141.
- Romanov, E., Potier, M., Zamorov, V., Ménard, F., 2009. The swimming crab *Charybdis smithii*: distribution, biology and trophic role in the pelagic ecosystem of the western Indian Ocean. *Marine Biology* 156 (6), 1089–1107.
- Romanov, E. V., Potier, M., Anderson, R. C., Quod, J. P., Ménard, F., Sattar, S. A., Hogarth, P., 2015. Stranding and mortality of pelagic crustaceans in the western Indian Ocean. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 95 (08), 1677–1684.
- Rossoll, D., Bermúdez, R., Hauss, H., Schulz, K. G., Riebesell, U., Sommer, U., Winder, M., 2012. Ocean Acidification-Induced Food Quality Deterioration Constrains Trophic Transfer. *PLoS ONE* 7 (4), e34737.
- Rudolf, V. H. W., 2007. Consequences of stage-structured predators: cannibalism, behavioral effects, and trophic cascades. *Ecology* 88 (12), 2991–3003.

- Ryan, C., McHugh, B., Trueman, C. N., Harrod, C., Berrow, S. D., O'Connor, I., 2012. Accounting for the effects of lipids in stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values) analysis of skin and blubber of balaenopterid whales: Lipid extraction in stable isotope analysis of whale skin and blubber. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 26 (23), 2745–2754.
- Sabarros, P., Ménard, F., Lévênez, J., Tew-Kai, E., Ternon, J., 2009. Mesoscale eddies influence distribution and aggregation patterns of micronekton in the Mozambique Channel. *Marine Ecology Progress Series* 395, 101–107.
- Saito, H., Ishihara, K., Murase, T., 1996. Effect of prey fish lipids on the docosahexaenoic acid content of total fatty acids in the lipid of *Thunnus albacares* yellowfin tuna. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 60 (6), 962–965.
- Saito, H., Ishihara, K., Murase, T., 1997. The fatty acid composition in tuna (bonito, *Euthynnus pelamis*) caught at three different localities from tropics to temperate. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73 (1), 53–59.
- Saito, H., Kotani, Y., 2000. Lipids of four boreal species of calanoid copepods: origin of monoene fats of marine animals at higher trophic levels in the grazing food chain in the subarctic ocean ecosystem. *Marine Chemistry* 71 (1-2), 69–82.
- Saito, H., Murata, M., 1998. Origin of the monoene fats in the lipid of midwater fishes: relationship between the lipids of myctophids and those of their prey. *Marine Ecology Progress Series* 168, 21–33.
- Saji, N. H., Goswami, B. N., Vinayachandran, P. N., Yamagata, T., 1999. A dipole mode in the tropical Indian Ocean. *Nature* 401 (6751), 360–363.
- Sardenne, F., Bodin, N., Chassot, E., Amiel, A., Fouché, E., Degroote, M., Hollanda, S. J., Pethybridge, H., Lebreton, B., Guillou, G., Ménard, F., 2015a. Trophic niches of sympatric tropical tuna in the Western Indian Ocean inferred by stable isotopes and neutral fatty acids. *Progress in Oceanography*.
- Sardenne, F., Chassot, E., Fouché, E., Ménard, F., Lucas, V., Bodin, N., 2015b. Are condition factors powerful proxies of energy content in wild tropical tunas?
- Sardenne, F., Dortel, E., Le Croizier, G., Million, J., Labonne, M., Leroy, B., Bodin, N., Chassot, E., 2015a. Determining the age of tropical tunas in the Indian Ocean from otolith microstructures. *Fisheries Research* 163, 44–57.
- Sardenne, F., Ménard, F., Degroote, M., Fouché, E., Guillou, G., Lebreton, B., Hollanda, S. J., Bodin, N., 2015b. Methods of lipid-normalization for multi-tissue stable isotope analyses in tropical tuna. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 29 (13), 1253–1267.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., Estevez, A., Jul. 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177 (1–4), 191–199.
- Sargent, J., Bell, J., Bell, M., Henderson, R., Tocher, D., 1993. The Metabolism of Phospholipids and Polyunsaturated Fatty Acids in Fish. In: Lahlou, B., Vitiello, P. (Eds.), *Aquaculture: Fundamental and Applied Research*. American Geophysical Union, pp. 103–124.

- Sawyer, J. M., Arts, M. T., Arhonditsis, G., Diamond, M. L., 2016. A general model of polyunsaturated fatty acid (PUFA) uptake, loss and transformation in freshwater fish. *Ecological Modelling* 323, 96–105.
- Schaefer, K. M., 1999. Comparative study of some morphological features of yellowfin (*Thunnus albacares*) and bigeye (*Thunnus obesus*) tunas. *Inter-American Tropical Tuna Commission Bulletin* 21 (7).
- Schaefer, K. M., Fuller, D., 2006. Estimates of age and growth of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in the eastern Pacific Ocean based on otolith increments and tagging data. Tech. rep., Inter-American Tropical Tuna Commission.
- Schaefer, K. M., Fuller, D. W., 2004. Behavior of bigeye (*Thunnus obesus*) and skipjack (*Katsuwonus pelamis*) tunas within aggregations associated with floating objects in the equatorial eastern Pacific. *Marine Biology* 146 (4), 781–792.
- Schaefer, K. M., Fuller, D. W., 2007. Vertical movement patterns of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) in the eastern equatorial Pacific Ocean, as revealed with archival tags. *Fishery Bulletin* 105 (3), 379–389.
- Schaefer, K. M., Fuller, D. W., Block, B. A., 2011. Movements, behavior, and habitat utilization of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) in the Pacific Ocean off Baja California, Mexico, determined from archival tag data analyses, including unscented Kalman filtering. *Fisheries Research* 112 (1-2), 22–37.
- Schlaepfer, M. A., Runge, M. C., Sherman, P. W., 2002. Ecological and evolutionary traps. *Trends in Ecology & Evolution* 17 (10), 474–480.
- Schlechtriem, C., Focken, U., Becker, K., 2003. Effect of different lipid extraction methods on $\delta^{13}\text{C}$ of lipid and lipid-free fractions of fish and different fish feeds. *Isotopes in Environmental and Health Studies* 39 (2), 135–140.
- Schmidt, K., McClelland, J. W., Mente, E., Montoya, J. P., Atkinson, A., Voss, M., 2004. Trophic-level interpretation based on $\delta^{15}\text{N}$ values: implications of tissue-specific fractionation and amino acid composition. *Marine Ecology Progress Series* 266, 43–58.
- Schmitz, G., Ecker, J., 2008. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Progress in Lipid Research* 47 (2), 147–155.
- Scholefield, A. M., Schuller, K. A., May 2014. Cell Proliferation and Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism in a Cell Line From Southern Bluefin Tuna (*Thunnus maccoyii*). *Lipids* 49 (7), 703–714.
- Scholefield, A. M., Tocher, D. R., Schuller, K. A., 2015. Dynamics of fatty acid metabolism in a cell line from southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*). *Aquaculture* 449, 58–68.
- Schott, F. A., McCreary Jr., J. P., 2001. The monsoon circulation of the Indian Ocean. *Progress in Oceanography* 51 (1), 1–123.
- Schulte-Hostedde, A. I., Zinner, B., Millar, J. S., Hickling, G. J., 2005. Restitution of mass–size residuals: validating body condition indices. *Ecology* 86 (1), 155–163.
- Sebastine, M., Chakraborty, K., Bineesh, K. K., Pillai, N. G. K., Abdussamad, E. M., Vijayan, K. K., 2011. Proximate composition and fatty acid profile of the myctophid *Diaphus watasei* Jordan & Starks, 1904 from the Arabian Sea. *Indian Journal of Fisheries* 58 (1), 103–107.

- Selmi, S., Sadok, S., 2010. The Influence of Season on Lipid Content and Fatty Acids Profile of *Euthynnus Alletteratus* Fillets and by-Products. *Journal of Muscle Foods* 21 (2), 365–378.
- Shadwick, R. E., Rapoport, H. S., Fenger, J. M., 2002. Structure and function of tuna tail tendons. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 133 (4), 1109–1125.
- Shelton, A. O., Hutchings, J. A., Waples, R. S., Keith, D. M., Akçakaya, H. R., Dulvy, N. K., 2015. Maternal age effects on atlantic cod recruitment and implications for future population trajectories. *ICES Journal of Marine Science*, fsv058.
- Sherwood, G. D., Rideout, R. M., Fudge, S. B., Rose, G. A., 2007. Influence of diet on growth, condition and reproductive capacity in Newfoundland and Labrador cod (*Gadus morhua*): Insights from stable carbon isotopes ($\delta^{13}\text{C}$). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 54 (23-26), 2794–2809.
- Shin, Y.-J., Rochet, M.-J., Jennings, S., Field, J. G., Gislason, H., 2005. Using size-based indicators to evaluate the ecosystem effects of fishing. *ICES Journal of Marine Science* 62 (3), 384–396.
- Shulman, G. E., Chesalin, M. V., Abolmasova, G. I., Yuneva, T. V., Kideys, A., 2002. Metabolic strategy in pelagic squid of genus *Sthenoteuthis* (Ommastrephidae) as the basis of high abundance and productivity: an overview of the Soviet investigations. *Bulletin of marine science* 71 (2), 815–836.
- Sidell, B. D., Crockett, E. L., Driedzic, W. R., 1995. Antarctic fish tissues preferentially catabolize monoenoic fatty acids. *Journal of Experimental Zoology* 271 (2), 73–81.
- Silversand, C., Haux, C., 1995. Fatty acid composition of vitellogenin from four teleost species. *Journal of comparative physiology B* 164 (8), 593–599.
- Simpkins, D. G., Hubert, W. A., Rio, C. M. D., Rule, D. C., 2003. Physiological Responses of Juvenile Rainbow Trout to Fasting and Swimming Activity: Effects on Body Composition and Condition Indices. *Transactions of the American Fisheries Society* 132 (3), 576–589.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 150 (1), 76–85.
- Smyntek, P. M., Teece, M. A., Schulz, K. L., Thackeray, S. J., 2007. A standard protocol for stable isotope analysis of zooplankton in aquatic food web research using mass balance correction models. *Limnology and Oceanography* 52 (5), 2135–2146.
- Soares, M. A., Bhaskar, P. V., Naik, R. K., Dessai, D., George, J., Tiwari, M., Anilkumar, N., 2015. Latitudinal $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ variations in particulate organic matter (POM) in surface waters from the Indian ocean sector of Southern Ocean and the Tropical Indian Ocean in 2012. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 118, Part B, 186–196.
- Sorbera, L. A., Asturiano, J. F., Carrillo, M., Zanuy, S., 2001. Effects of Polyunsaturated Fatty Acids and Prostaglandins on Oocyte Maturation in a Marine Teleost, the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biology of Reproduction* 64 (1), 382–389.
- Sotiropoulos, M. A., Tonn, W. M., Wassenaar, L. I., 2004. Effects of lipid extraction on stable carbon and nitrogen isotope analyses of fish tissues: potential consequences for food web studies. *Ecology of Freshwater Fish* 13 (3), 155–160.

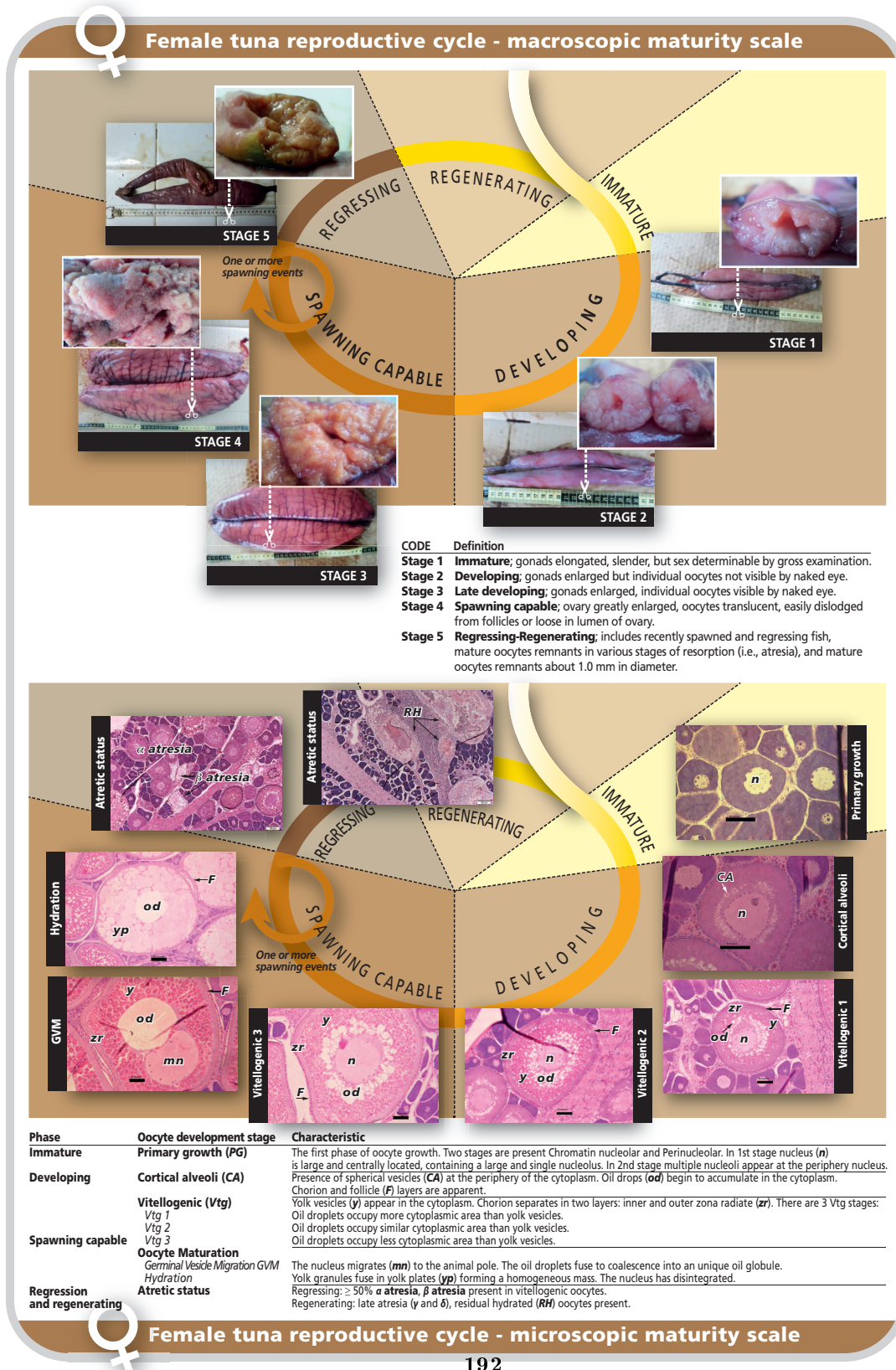
- Springer, T. A., Murphy, B. R., 1990. Properties of Relative Weight and other Condition Indices. Transactions of the American Fisheries Society 119 (6), 1048–1058.
- Stéquert, B., Conand, F., 2004. Age and growth of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in the western Indian Ocean. Cybium 28 (2), 163–170.
- Stéquert, B., Rodriguez, J. N., Cuisset, B., Le Menn, F., 2001. Gonadosomatic index and seasonal variations of plasma sex steroids in skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) and yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) from the western Indian ocean. Aquatic Living Resources 14 (05), 313–318.
- Stevens, E. D., Fry, F. E. J., 1972. The effect of changes in ambient temperature on spontaneous activity in skipjack tuna. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 42 (3), 803–805.
- Stevenson, R. D., Woods, W. A., 2006. Condition indices for conservation: new uses for evolving tools. Integrative and Comparative Biology 46 (6), 1169–1190.
- Suda, A., Kaiya, H., Nikaido, H., Shiozawa, S., Mishiro, K., Ando, H., 2012. Identification and gene expression analyses of ghrelin in the stomach of Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). General and Comparative Endocrinology 178 (1), 89–97.
- Sun, C.-L., Huang, C.-L., Yeh, S.-Z., 2001. Age and growth of the bigeye tuna, *Thunnus obesus*, in the western Pacific Ocean. Fishery Bulletin 99 (3).
- Swanson, J. E., Lokesh, B. R., Kinsella, J. E., 1989. Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase of mouse cardiac sarcoplasmic reticulum is affected by membrane n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acid content. The Journal of Nutrition 119 (3), 364–372.
- Sweeting, C. J., Polunin, N. V. C., Jennings, S., 2006. Effects of chemical lipid extraction and arithmetic lipid correction on stable isotope ratios of fish tissues. Rapid Communications in Mass Spectrometry 20 (4), 595–601.
- Swimmer, Y., McNaughton, L., Moyes, C., Brill, R., 2005. Metabolic biochemistry of cardiac muscle in three tuna species (bigeye, *Thunnus obesus*; yellowfin, *T. albacares*; and skipjack, *Katsuwonus pelamis*) with divergent ambient temperature and oxygen tolerances. Fish Physiology and Biochemistry 30 (1), 27–35.
- Syme, D. A., Shadwick, R. E., 2002. Effects of longitudinal body position and swimming speed on mechanical power of deep red muscle from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). Journal of Experimental Biology 205 (2), 189–200.
- Syväranta, J., Rautio, M., 2010. Zooplankton, lipids and stable isotopes: importance of seasonal, latitudinal, and taxonomic differences. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 67 (11), 1721–1729.
- Tew-Kai, E., Marsac, F., 2009. Patterns of variability of sea surface chlorophyll in the Mozambique Channel: a quantitative approach. Journal of Marine Systems 77 (1), 77–88.
- Tew Kai, E., Marsac, F., 2010. Influence of mesoscale eddies on spatial structuring of top predators' communities in the Mozambique Channel. Progress in Oceanography 86 (1-2), 214–223.
- Thomas, M. K., Kremer, C. T., Klausmeier, C. A., Litchman, E., 2012. A global pattern of thermal adaptation in marine phytoplankton. Science 338 (6110), 1085–1088.

- Tocher, D. R., Apr. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. Reviews in Fisheries Science 11 (2), 107–184.
- Tocher, D. R., Bendiksen, E. Å., Campbell, P. J., Bell, J. G., Aug. 2008. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. Aquaculture 280 (1-4), 21–34.
- Trueman, C. N., McGill, R. A. R., Guyard, P. H., 2005. The effect of growth rate on tissue-diet isotopic spacing in rapidly growing animals. An experimental study with Atlantic salmon (*Salmo salar*). Rapid Communications in Mass Spectrometry 19 (22), 3239–3247.
- Ueki, N., Ochiai, Y., 2004. Primary structure and thermostability of bigeye tuna myoglobin in relation to those of other scombridae fish. Fisheries Science 70 (5), 875–884.
- Underwood, A. J., 1997. Experiments in ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance. Cambridge University Press.
- Valente, L. M. P., Rocha, E., Gomes, E. F. S., Silva, M. W., Oliveira, M. H., Monteiro, R. a. F., Fauconneau, B., 1999. Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast- and slow-growing strains of rainbow trout. Journal of Fish Biology 55 (4), 675–691.
- Varela, J. L., Ortega, A., de la Gándara, F., Medina, A., 2015. Effects of starvation on $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ in Atlantic bonito, *Sarda sarda* (Bloch, 1793). Aquaculture Research 46 (8), 2043–2047.
- Veefkind, R. J., 1997. Carbon isotope ratios and composition of fatty acids: tags and trophic markers in pelagic organisms. Ph.D. thesis, University of Victoria.
- Vipin, P. M., Ravi, R., Fernandez, T. J., Pradeep, K., Boopendranath, M. R., Remesan, M. P., 2012. Distribution of myctophid resources in the Indian Ocean. Reviews in Fish Biology and Fisheries 22 (2), 423–436.
- Vlieg, P., Habib, G., Clement, G. I. T., 1983. Proximate composition of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* from New Zealand and New Caledonian waters. New Zealand journal of science.
- Vlieg, P., Murray, T., Dec. 1988. Proximate composition of albacore tuna, *Thunnus alalunga*, from the temperate South Pacific and Tasman Sea. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 22 (4), 491–496.
- Volkman, J. K., Barrett, S. M., Blackburn, S. I., Mansour, M. P., Sikes, E. L., Gelin, F., 1998. Microalgal biomarkers: A review of recent research developments. Organic Geochemistry 29 (5–7), 1163–1179.
- Wassall, S. R., Brzustowicz, M. R., Shaikh, S. R., Cherezov, V., Caffrey, M., Stillwell, W., 2004. Order from disorder, corralling cholesterol with chaotic lipids: The role of polyunsaturated lipids in membrane raft formation. Chemistry and Physics of Lipids 132 (1), 79–88.
- Wassall, S. R., Stillwell, W., 2009. Polyunsaturated fatty acid–cholesterol interactions: Domain formation in membranes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1788 (1), 24–32.
- Watts, D. A., Rice, R. H., Brown, W. D., 1980. The primary structure of myoglobin from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). Journal of Biological Chemistry 255 (22), 10916–10924.

- Weatherley, A. H., Gill, H. S., Rogers, S. C., 1979. Growth dynamics of muscle fibres, dry weight, and condition in relation to somatic growth rate in yearling rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Canadian Journal of Zoology 57 (12), 2385–2392.
- Weber, L. P., Higgins, P. S., Carlson, R. I., Janz, D. M., 2003. Development and validation of methods for measuring multiple biochemical indices of condition in juvenile fishes. Journal of Fish Biology 63 (3), 637–658.
- Wegner, N. C., Sepulveda, C. A., Bull, K. B., Graham, J. B., 2009. Gill morphometrics in relation to gas transfer and ram ventilation in high-energy demand teleosts: Scombrids and billfishes. Journal of Morphology 271 (1), 36–49.
- Werbrouck, E., Gansbeke, D. V., Vanreusel, A., Mensens, C., Troch, M. D., 2016. Temperature-induced changes in fatty acid dynamics of the intertidal grazer *Platychelipus littoralis* (Crustacea, Copepoda, Harpacticoida): insights from a short-term feeding experiment. Journal of Thermal Biology.
- Wexler, J. B., Chow, S., Wakabayashi, T., Nohara, K., Margulies, D., 2007. Temporal variation in growth of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) larvae in the Panama Bight, 1990. Fishery Bulletin 105 (1), 1–18.
- Wexler, J. B., Margulies, D., Scholey, V. P., 2011. Temperature and dissolved oxygen requirements for survival of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*, larvae. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 404 (1–2), 63–72.
- Wexler, J. B., Scholey, V. P., Olson, R. J., Margulies, D., Nakazawa, A., Suter, J. M., 2003. Tank culture of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*: developing a spawning population for research purposes. Aquaculture 220 (1–4), 327–353.
- White, J. W., Warner, R. R., 2007. Behavioral and energetic costs of group membership in a coral reef fish. Oecologia 154 (2), 423–433.
- Wiegand, M. D., Johnston, T. A., Martin, J., Leggett, W. C., 2004. Variation in neutral and polar lipid compositions of ova in ten reproductively isolated populations of walleye (*Sander vitreus*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 61 (1), 110–121.
- Willis, J., Hobday, A. J., 2008. Application of bioelectrical impedance analysis as a method for estimating composition and metabolic condition of southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) during conventional tagging. Fisheries Research 93 (1–2), 64–71.
- Wilson, R. M., Chanton, J. P., Balmer, B. C., Nowacek, D. P., 2014. An evaluation of lipid extraction techniques for interpretation of carbon and nitrogen isotope values in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) skin tissue. Marine Mammal Science 30 (1), 85–103.
- Wood, S., Wood, M. S., 2015. Package ‘mgcv’. R package version, 1.7–29.
- Yanes-Roca, C., Rhody, N., Nystrom, M., Main, K. L., 2009. Effects of fatty acid composition and spawning season patterns on egg quality and larval survival in common snook (*Centropomus undecimalis*). Aquaculture 287 (3), 335–340.
- Young, J. W., Guest, M. A., Lansdell, M., Phleger, C. F., Nichols, P. D., 2010a. Discrimination of prey species of juvenile swordfish *Xiphias gladius* (Linnaeus, 1758) using signature fatty acid analyses. Progress in Oceanography 86 (1–2), 139–151.

- Young, J. W., Lansdell, M. J., Campbell, R. A., Cooper, S. P., Juanes, F., Guest, M. A., 2010b. Feeding ecology and niche segregation in oceanic top predators off eastern Australia. *Marine Biology* 157 (11), 2347–2368.
- Zilli, L., Schiavone, R., Zonno, V., Storelli, C., Vilella, S., 2004. Adenosine triphosphate concentration and β -d-glucuronidase activity as indicators of sea bass semen quality. *Biology of reproduction* 70 (6), 1679–1684.
- Zudaire, I., Murua, H., Grande, M., Bodin, N., 2013a. Reproductive potential of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) in the western Indian Ocean. *Fishery Bulletin* 111 (3), 252–264.
- Zudaire, I., Murua, H., Grande, M., Goñi, N., Potier, M., Ménard, F., Chassot, E., Bodin, N., 2015. Variations in the diet and stable isotope ratios during the ovarian development of female yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) in the Western Indian Ocean. *Marine Biology*, 1–15.
- Zudaire, I., Murua, H., Grande, M., Korta, M., Arrizabalaga, H., Areso, J. J., Delgado-Molina, A., 2013b. Fecundity regulation strategy of the yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) in the Western Indian Ocean. *Fisheries Research* 138, 80–88.
- Zudaire, I., Murua, H., Grande, M., Pernet, F., Bodin, N., 2014. Accumulation and mobilization of lipids in relation to reproduction of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) in the Western Indian Ocean. *Fisheries Research* 160, 50–59.
- Zuyev, G., Nigmatullin, C., Chesalin, M., Nesis, K., 2002. Main results of long-term worldwide studies on tropical nektonic oceanic squid genus *Sthenoteuthis*: an overview of the Soviet investigations. *Bulletin of Marine Science* 71 (2), 1019–1060.

Annexe A : Stades de maturité macro- et microscopiques des gonades chez les thons tropicaux (IOTC, 2015a).



Annexe B : Compositions en acides gras et isotopiques d'une partie des proies des thons tropicaux issues de la littérature.

Lorsqu'aucunes données publiées n'existent sur les proies avérées des thons tropicaux dans l'océan Indien, les données fournies concernent des espèces proches, comme c'est le cas pour les compositions en acides gras. Les proportions en acides gras mono- et poly-insaturés (MUFA et PUFA respectivement) sont encadrées dans les tableaux, pour faciliter la lecture.

Table B1 : Compositions en acides gras (en % du total) des lipides de stockage de 11 espèces de myctophidés de la mer du Japon - **Saito & Murata 1998**

Table 5. Mean \pm SE (n = 3) fatty acid composition in the triacylglycerols of 11 species of Myctophidae expressed as weight percent of total fatty acids

	<i>Cerato- scopelus warmingi</i>	<i>Noto- scopelus resplendens</i>	<i>Noto- scopelus japonicus</i>	<i>Symbulo- phorus californiensis</i>	<i>Diaphus theta</i>	<i>Diaphus gigas</i>	<i>Mycto- phum asperum</i>	<i>Lampro- nyctus jordanii</i>	<i>Lampro- nyctus festivus</i>	<i>Protomycio- phum thompsoni</i>	<i>Lampro- nyctus regalis</i>
Total saturated	32.1	27.8	20.7	26.5	27.7	28.7	32.9	21.5	25.9	21.3	16.4
14:0	2.5 \pm 0.2	1.4 \pm 0.1	1.7 \pm 0.5	2.9 \pm 0.2	3.0 \pm 0.2	6.2 \pm 0.9	3.8 \pm 0.2	3.4 \pm 0.9	2.3 \pm 0.3	4.4 \pm 0.5	3.9 \pm 0.7
15:0	0.4 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.3 \pm 0.1	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	0.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0
16:0	21.5 \pm 1.1	19.3 \pm 1.7	13.7 \pm 2.0	16.8 \pm 2.8	18.1 \pm 1.4	17.8 \pm 1.2	22.9 \pm 1.7	14.5 \pm 0.6	17.9 \pm 1.5	14.0 \pm 0.5	11.0 \pm 0.5
17:0	0.6 \pm 0.1	0.4 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	0.6 \pm 0.0	0.4 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1	0.4 \pm 0.0	0.9 \pm 0.2	0.5 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0
18:0	6.9 \pm 0.3	6.2 \pm 0.8	4.3 \pm 1.1	5.6 \pm 1.1	5.5 \pm 1.1	3.7 \pm 0.2	4.1 \pm 0.1	2.7 \pm 0.7	4.2 \pm 0.5	1.9 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1
20:0	0.2 \pm 0.0	0.3 \pm 0.1	0.3 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.2 \pm 0.1	0.3 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0
Total monoenoic	44.0	52.3	55.4	50.7	52.9	48.9	37.2	57.1	57.5	53.9	66.5
14:1	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.0	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.2 \pm 0.1
16:1n-7	4.0 \pm 0.1	4.0 \pm 0.2	2.4 \pm 0.1	3.9 \pm 0.8	4.6 \pm 0.3	6.4 \pm 0.7	5.9 \pm 0.7	5.5 \pm 0.2	5.0 \pm 0.4	6.6 \pm 0.3	6.1 \pm 0.3
16:1n-5	0.1 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.0	0.3 \pm 0.1
17:1	0.2 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.3 \pm 0.1	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.1	0.2 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0
18:1n-9	31.2 \pm 2.2	32.9 \pm 3.1	21.4 \pm 6.8	28.1 \pm 5.3	27.0 \pm 4.5	20.1 \pm 0.5	22.6 \pm 1.7	19.3 \pm 5.7	30.6 \pm 1.3	14.3 \pm 1.5	18.2 \pm 0.3
18:1n-7	3.5 \pm 0.2	5.0 \pm 0.3	3.9 \pm 1.1	3.9 \pm 0.6	3.1 \pm 0.3	2.6 \pm 0.2	3.2 \pm 0.4	4.5 \pm 0.5	4.4 \pm 0.3	3.1 \pm 0.1	4.4 \pm 0.2
18:1n-5	0.1 \pm 0.0	0.3 \pm 0.2	0.4 \pm 0.2	0.6 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	0.8 \pm 0.0	0.2 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	0.4 \pm 0.3	0.8 \pm 0.1	0.8 \pm 0.3
20:1n-11	0.3 \pm 0.1	2.0 \pm 0.1	8.3 \pm 2.6	4.0 \pm 0.4	3.8 \pm 0.4	5.1 \pm 1.4	3.2 \pm 0.1	6.4 \pm 2.4	1.7 \pm 0.6	6.5 \pm 1.2	9.7 \pm 0.7
20:1n-9	2.7 \pm 0.1	4.7 \pm 0.8	4.8 \pm 3.8	2.0 \pm 0.2	2.8 \pm 0.9	2.0 \pm 0.4	1.8 \pm 0.3	5.4 \pm 0.5	5.4 \pm 0.5	3.4 \pm 0.7	7.7 \pm 0.3
20:1n-7	0.2 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	0.4 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1	0.5 \pm 0.2	0.5 \pm 0.1	0.5 \pm 0.2	0.6 \pm 0.1	4.4 \pm 0.3	0.6 \pm 0.0	0.8 \pm 0.1
22:1n-11	0.6 \pm 0.1	1.4 \pm 1.3	10.8 \pm 7.2	5.7 \pm 1.0	5.4 \pm 0.4	5.5 \pm 2.3	3.5 \pm 0.2	10.4 \pm 3.6	2.3 \pm 0.9	11.4 \pm 2.7	14.6 \pm 0.4
22:1n-9	0.5 \pm 0.0	0.4 \pm 0.1	1.1 \pm 0.4	0.8 \pm 0.1	1.6 \pm 1.3	3.3 \pm 0.3	3.7 \pm 0.2	1.9 \pm 0.3	1.2 \pm 0.5	3.4 \pm 0.2	1.6 \pm 0.1
22:1n-7	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.3 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1	0.3 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1
24:1n-9	0.4 \pm 0.0	0.5 \pm 0.1	1.0 \pm 0.5	0.7 \pm 0.1	1.6 \pm 0.7	1.5 \pm 0.3	1.5 \pm 0.1	1.4 \pm 0.3	1.2 \pm 0.4	2.4 \pm 0.4	1.5 \pm 0.1
Total polyenoic	20.5	17.6	19.4	19.6	16.5	17.5	25.3	18.0	17.9	20.6	22.3
16:2n-6	0.9 \pm 0.2	0.5 \pm 0.0	0.6 \pm 0.3	0.5 \pm 0.1	1.0 \pm 0.3	1.3 \pm 0.1	1.6 \pm 0.2	1.2 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	3.3 \pm 0.7
18:2n-6	0.9 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	1.2 \pm 0.2	1.0 \pm 0.1	0.9 \pm 0.0	1.1 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	0.9 \pm 0.0	1.1 \pm 0.3
20:4n-6	0.9 \pm 0.2	0.9 \pm 0.2	0.7 \pm 0.2	0.5 \pm 0.2	0.6 \pm 0.3	0.4 \pm 0.1	1.7 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	1.0 \pm 0.2	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.1
18:3n-3	0.6 \pm 0.0	0.5 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.7 \pm 0.4	0.5 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.5 \pm 0.2	0.5 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0
18:4n-3	0.8 \pm 0.1	0.5 \pm 0.2	0.9 \pm 0.2	1.3 \pm 0.9	0.6 \pm 0.1	1.4 \pm 0.3	3.8 \pm 0.0	1.2 \pm 0.2	0.5 \pm 0.2	1.4 \pm 0.0	0.4 \pm 0.1
20:4n-3	1.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.3	1.9 \pm 0.3	1.3 \pm 0.8	0.9 \pm 0.0	0.9 \pm 0.1	3.9 \pm 0.1	0.7 \pm 0.2	0.7 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1	0.4 \pm 0.3
20:5n-3	5.8 \pm 0.4	5.9 \pm 0.2	6.0 \pm 0.7	7.0 \pm 4.4	4.5 \pm 2.5	6.2 \pm 1.1	5.6 \pm 0.5	6.8 \pm 1.2	4.9 \pm 1.0	8.1 \pm 0.8	2.5 \pm 0.5
22:5n-3	1.1 \pm 0.0	1.3 \pm 0.2	1.6 \pm 0.2	0.9 \pm 0.5	0.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.0	1.7 \pm 0.1	0.8 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	0.7 \pm 0.3
22:6n-3	8.5 \pm 0.4	6.2 \pm 0.4	6.0 \pm 0.5	6.2 \pm 3.2	6.8 \pm 3.2	5.3 \pm 0.7	11.1 \pm 0.4	5.2 \pm 0.9	7.6 \pm 0.5	6.6 \pm 0.7	3.5 \pm 0.5

Figure B1 : Proportions des trois principales familles d'acides gras (SFA=Acides gras saturés; MUFA=Acides gras mono-insaturés; PUFA=Acides gras poly-insaturés) dans les lipides totaux du muscle de *Diaphus wataesi*, un myctophidé de la Mer d'Arabie – **Sebastine et al. 2011**

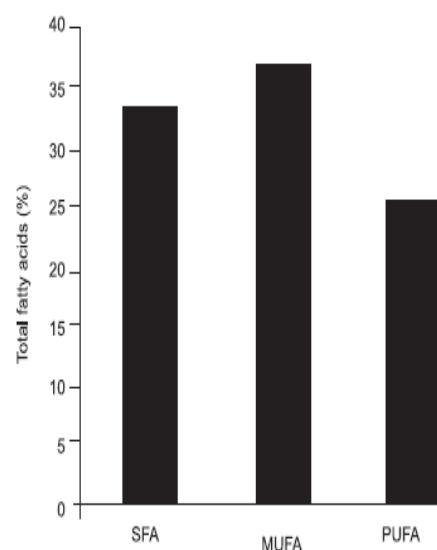


Table B2 : Compositions en acides gras (en %) des lipides totaux du muscle de 3 espèces de myctophidés du sud-ouest de l'Inde – **Baby et al. 2014**

Fatty acids	<i>Diaphus watasei</i>	<i>Diaphus haekeni</i>	<i>Myctophum obtusirostre</i>
Lauric, C12	0.14 ± 0.08	0.13 ± 0.03	0.42 ± 0.02
Tridecyllic, C13	0.03 ± 0.02	0.08 ± 0.05	0.11 ± 0.09
Myristic, C14	6.64 ± 0.20*	6.03 ± 0.22*	7.88 ± 0.32*
Pentadecylic, C15	0.62 ± 0.05**	1.38 ± 0.02*	1.36 ± 0.03*
Palmitic, C16	35.98 ± 0.16*	28.62 ± 2.27*	30.09 ± 0.66*
Margaric, C17	1.05 ± 0.05	1.52 ± 0.08	1.21 ± 0.08
Stearic, C18	0.07 ± 1.84*	7.84 ± 0.06*	5.40 ± 0.08*
Nonadecylic, C19	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Arachidic, C20	0.68 ± 0.20	0.65 ± 0.35	0.45 ± 0.13
Behenic, C22	0.45 ± 0.32	0.34 ± 0.99	0.21 ± 0.17
Lignoceric, C 24	0.21 ± 0.06	0.34 ± 0.59	0.15 ± 0.08
Myristoleic, C14:1	0.12 ± 0.09	0.12 ± 0.05	0.18 ± 0.01
Pentadecenoic, C15:1	0.16 ± 0.53*	0.14 ± 0.37*	0.74 ± 0.14**
Palmitoleic, C16:1	5.27 ± 0.04*	5.44 ± 0.63*	6.03 ± 0.66*
Heptadecenoic, C17:1	1.41 ± 0.02**	0.23 ± 0.15*	0.22 ± 0.06*
Oleic, C18:1	19.39 ± 0.03*	19.63 ± 0.53*	21.75 ± 1.53*
Gadoleic, C20:1	3.33 ± 0.01*	1.18 ± 0.11*	2.02 ± 0.08*
Erucic, C 22:1	0.49 ± 0.01	0.14 ± 0.79	0.08 ± 0.09
Nervonic, C 24:1	0.78 ± 0.06	0.64 ± 1.28	0.36 ± 0.25
Linoleic, C18:2n-6	1.18 ± 0.02*	0.13 ± 1.98**	1.64 ± 0.07*
Α linoleic, C18:3n-3	0.19 ± 0.01	0.31 ± 0.06	0.37 ± 0.01
Γ linoleic C18:3n-6	0.31 ± 0.02	0.68 ± 0.20	0.69 ± 0.01
C20:3n-3	0.17 ± 0.15**	0.19 ± 0.04*	0.41 ± 0.09*
Dihomogammalinolenic, C20:3n-6	1.32 ± 0.18	0.30 ± 0.94	0.20 ± 0.20
Arachidonic, C20:4n-6	2.21 ± 0.04	2.44 ± 2.45	2.21 ± 0.54
EPA, C20:5n-3	4.32 ± 0.49**	5.41 ± 0.46*	5.76 ± 0.91*
C22:2	0.04 ± 1.11	0.06 ± 0.15	0.17 ± 0.02
DHA, C22:6	12.62 ± 1.52*	15.90 ± 1.00*	9.83 ± 2.01*
Σ SFA	45.87	46.72	47.28
Σ MUFA	30.95	27.52	31.38
Σ PUFA	22.36	25.29	21.28
ω3	17.3*	21.81*	16.37*
ω6	5.02*	3.55*	4.74*
n3/n6 ratio	3.44**	6.14*	3.45*

Table B3 : Compositions en acides gras (en %) des lipides totaux de *Charybdis hawaiiensis* (i.e. un crabe nageur), dans l'océan Pacifique – **Piché et al. 2010**

Saturated FA	
14:0	1.20 ± 0.56
16:0	16.50 ± 2.52
18:0	8.95 ± 0.94
subtotal:	26.65 ± 2.75
Monounsaturated FA	
16:1n-7	3.07 ± 1.03
18:1n-9	9.33 ± 0.92
18:1n-7	2.54 ± 0.42
20:1n-9	0.88 ± 0.34
22:1n-11	0.50 ± 0.51
subtotal:	16.32 ± 2.13
Polyunsaturated FA	
18:2n-6	2.22 ± 0.43
20:4n-6	14.33 ± 2.89
22:4n-6	1.32 ± 0.79
20:5n-3	9.63 ± 1.75
22:5n-6	0.62 ± 0.13
22:5n-3	1.56 ± 0.36
22:6n-3	11.86 ± 2.53
subtotal:	41.55 ± 5.42
Total:	84.52 ± 2.07

Table B4 : Compositions en acides gras (en %) des lipides totaux de *Charybdis lucifera*, à différent stade de développement, dans le Golfe du Bengale – **Kannupandi et al. 2006**

	I	First crab
12:0	0.58	1.09
14:0	0.76	2.61
15:0	0.79	2.85
16:1n-7	3.70	3.02
16:0	12.95	15.05
17:1n-5	0.44	3.69
17:0	2.38	3.33
17:1n-8	1.84	0.91
18:3n-6	1.04	2.83
18:0	9.73	8.00
18:1n-9	6.97	11.88
18:2n-6, 9	2.32	3.50
18:1n-7	3.99	1.33
19:0	0.48	1.63
19:1	2.93	6.96
20:4n-6	9.46	2.69
20:5n-3	14.24	10.74
20:1n-9	1.02	-
20:0	2.52	1.69
20:2n-6, 9	0.91	2.91
20:3n-6, 9,12	2.69	1.20
22:6n-3	18.52	12.40
Saturated	30.19	36.25
Monounsaturated	23.49	28.99
Polyunsaturated	46.49	35.07

Figure B2 : Composition isotopiques, après délipidation au dichlorométhane, d'espèces présentes dans l'ouest de l'océan Indien (en l'occurrence issues du canal du Mozambique) – **Ménard et al. 2014**
Les 4 espèces indiquées sont des proies connues des thons tropicaux.

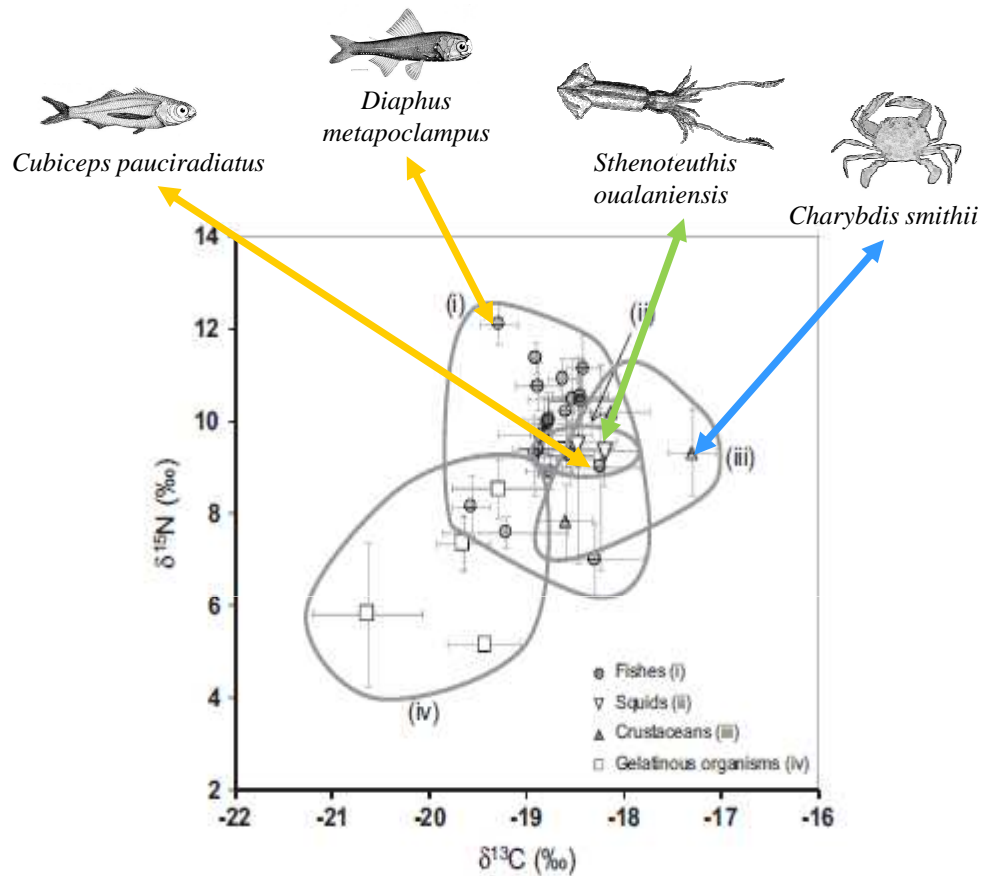


Fig. 2. Summary of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ isotope signatures (mean \pm standard deviation in per mil) of micronekton taxa sampled in the Mozambique Channel. Set diagrams group the four broad categories (fishes, squids, crustaceans and gelatinous organisms).